



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS DE SÉMEN FRESCO DE GATOS
DOMÉSTICOS, RECOLHIDO POR CATETERIZAÇÃO URETRAL E A PARTIR DO
EPIDÍDIMO, UTILIZANDO DOIS PROTOCOLOS ANESTÉSICOS DIFERENTES

JOSEFA RAQUEL ARAÚJO FLORINDO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

Dra. Sónia Margarida Rodrigues Miranda

ORIENTADOR

Dra. Sónia Margarida Rodrigues
Miranda

CO-ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal
Mateus

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS DE SÉMEN FRESCO DE GATOS
DOMÉSTICOS, RECOLHIDO POR CATETERIZAÇÃO URETRAL E A PARTIR DO
EPIDÍDIMO, UTILIZANDO DOIS PROTOCOLOS ANESTÉSICOS DIFERENTES

JOSEFA RAQUEL ARAÚJO FLORINDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

Dra. Sónia Margarida Rodrigues Miranda

ORIENTADOR

Dra. Sónia Margarida Rodrigues
Miranda

CO-ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal
Mateus

2011

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sónia Miranda por me ter orientado na realização deste trabalho, pelo conhecimento transmitido ao longo do estágio, pelo apoio, amizade, paciência, incentivo e disponibilidade constante.

À Professora Luísa Mateus por toda a ajuda prestada na elaboração desta dissertação, pelo apoio e pela permanente disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida.

A toda a equipa do Hospital Veterinário do Baixo Vouga, pela simpatia com que nos receberam desde o primeiro dia, pelos conhecimentos transmitidos, pelo excelente ambiente ali vivido e pelas amizades que se formaram. Agradeço em particular à Mafalda, pela ajuda valiosa prestada na realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo seu amor incondicional, porque sempre acreditaram em mim e me ajudaram a ultrapassar todas as adversidades que se interpuseram ao longo destes anos. Pelo enorme esforço realizado e por me possibilitarem a concretização deste sonho. À minha Mãe porque me transmitiu a paixão pelos animais. Ao meu Pai pela pessoa extraordinária que é. O meu sincero Obrigado.

À minha irmã Joana porque apesar da nossa relação nem sempre fácil, me inspira diariamente. Por toda a paciência e amizade.

À minha avó Maria Silvina pela boa disposição constante, amizade, carinho e confiança infindáveis.

À minha tia Maribel por toda a amizade, compreensão e apoio demonstrado.

Ao meu primo Miguel por ser sempre tão franco e verdadeiro.

Aos amigos “Senhor” Zé e D. Elina por sempre me terem recebido em sua casa de braços abertos, me terem acarinhado e tornado o meu percurso académico em Lisboa mais fácil.

Aos meus primos Fátima, Luís, Sara e Marta pela amizade, carinho e disponibilidade demonstrada durante estes últimos anos. Por me terem ajudado quando mais precisei.

À Daniela pela nossa amizade imperfeitamente perfeita.

À Joana Palminha por todos os momentos que passamos juntas, pelo facto de gostares tanto da minha terrinha como eu, pela amiga que te tornaste e pela pessoa especial que és.

À Ana Chaves, Catarina Vieira, Cláudia, Joana Simões, Lena, Mariana Pereira, Mariana Figueiredo, Ivo e Margarida por todos os bons momentos que passamos juntos e pelos laços de amizade criados.

Aos meus colegas de estágio, que foram sem dúvidas excepcionais e constituíram a companhia perfeita para estes 5 meses. Às amigas que se formaram e aos momentos partilhados. Não esquecerei o apoio prestado na realização deste trabalho.

Aos restantes colegas e amigos que tive o prazer de conhecer ao longo do meu percurso académico.

Ao Boni, meu companheiro de quatro patas, que está e esteve sempre presente ao longo destes anos. Ao Pirata e à Izy, os meus companheiros felinos. É por eles e para eles...

A todos aqueles que directa ou indirectamente tornaram a concretização deste sonho possível.

RESUMO

Título: Estudo comparativo das características de sémen fresco de gatos domésticos, recolhido por cateterização uretral e a partir do epidídimo, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes

Resumo: A colheita de sémen permite a aquisição de material genético para uso na clínica reprodutiva, na biotecnologia da reprodução e na investigação e constitui uma das principais dificuldades na espécie felina não sendo ainda utilizada por rotina na prática clínica. Nos gatos, as técnicas de colheita de sémen mais frequentemente utilizadas são a vagina artificial e a electroejaculação. A recolha de sémen a partir da cauda do epidídimo representa uma alternativa prática quando não existe acesso ao equipamento para a realização dos dois métodos anteriormente descritos. Recentemente, foi descrita uma nova técnica de colheita de sémen em gatos por cateterização uretral, sem recurso à estimulação eléctrica, após administração de medetomidina. Esta técnica contorna várias das dificuldades e permite obter sémen de boa qualidade.

Foi objectivo deste estudo, comparar as características do sémen fresco de gatos domésticos obtido por cateterização uretral e a partir do epidídimo e verificar qual a influência de dois protocolos anestésicos nos parâmetros: mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia.

Conclui-se que independentemente da técnica de colheita de sémen, por cateterização uretral ou a partir do epidídimo, ou do protocolo anestésico utilizado, medetomidina isolada ou em associação com a cetamina, os valores obtidos para a mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia são semelhantes, não sendo significativas as diferenças observadas.

Palavras-chave: cateterização uretral, epidídimo, gato doméstico, cetamina, medetomidina, sémen fresco

ABSTRACT

Title: Comparative study of the characteristics of fresh semen of domestic cats, collected by urethral catheterization and from the epididymis, using two different anesthetic protocols

Abstract: The collection of cat's semen allows the acquisition of genetic material for use in reproductive clinic, breeding biotechnologies and research. This procedure constitutes one of the main difficulties in felines and is not yet routinely used in clinical practice. In cats, the most commonly used techniques of semen collection are the artificial vagina and electroejaculation. The retrieval of epididymal semen from the cauda epididymis represents a practical alternative to the two methods described above. Recently, there was a new technique described for semen collection in cats through urethral catheterization, without resorting to electrical stimulation and following the administration of medetomidine. This technique bypasses many of the difficulties and allows for good quality semen collection.

The objective of this study was to compare the characteristics of domestic cat's fresh semen obtained by urethral catheterization and from the epididymis, as well as to analyze the influence of two anesthetic protocols in the following parameters: total mobility, progressive mobility and morphology.

It was concluded that regardless the harvesting technique or the anesthetic protocol used, the results for total mobility, progressive mobility and morphology were similar, and no significant differences were observed.

Key words: urethral catheterization, epididymis, domestic cat, ketamine, medetomidine, fresh semen

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice geral	v
Lista de figuras, gráficos e tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas e símbolos	vii
I- Introdução	1
II- Revisão Bibliográfica	3
1. Anatomia do aparelho reprodutor do gato	3
2. Fisiologia reprodutiva do gato	4
2.1. Espermatogénese	4
2.2. Esteroidogénese	6
2.3. Comportamento reprodutivo do gato.....	7
3. Importância da colheita e avaliação do sémen de gatos domésticos	8
4. Técnicas de colheita de sémen	11
5. Breve descrição farmacológica da medetomidina e da cetamina	18
5.1. Medetomidina	18
5.2. Cetamina	21
6. Parâmetros de avaliação do sémen	25
6.1. Volume	25
6.2. Cor	26
6.3. Mobilidade.....	27
6.4. Morfologia	29
6.5. Concentração	32
6.6. Integridade da membrana	33
6.7. pH	34
6.8. Osmolalidade	34
6.9. Fosfatase alcalina.....	34
6.10. Microbiologia seminal.....	34
7. Relação entre a qualidade do sémen e a fertilidade	35
III- Estudo.....	37
1. Objectivo.....	37
2. Material e métodos	37
2.1. Animais	37
2.2. Colheita e avaliação de sémen	37
2.3. Análise estatística	40
3. Resultados.....	40
3.1. Exame físico e andrológico	40
3.2. Cor do sémen recolhido por CT	40
3.3. Resultados individuais para os parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos domésticos	41
3.4. Mobilidade	42
3.5. Viabilidade e morfologia.....	44
4. Discussão	48
5. Conclusão	51
IV- Bibliografia	52
Anexo I- Alterações morfológicas dos spz.....	58

LISTA DE FÍGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Lista de Figuras

Figura 1 – Espermatogénese.....	5
Figura 2 – Amostra de sémen de gato doméstico corada com eosina-nigrosina em que se diferencia spz vivos (brancos) de mortos (rosa).....	31
Figura 3 – Recolha de sémen por CT	39
Figura 4 – A: Testículo com epidídimo; B: Epidídimo contralateral separado do respectivo testículo.....	39

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Mobilidade total (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	42
Gráfico 2 – Média da mobilidade progressiva (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	43
Gráfico 3 – Média de spz vivos e morfológicamente normais (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	44
Gráfico 4 – Média das alterações morfológicas (em percentagem) nos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	45
Gráfico 5 – Média de spz vivos e com alterações na cabeça, peça intermédia (PI) e cauda (em percentagem) nos quatro grupos	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade do sémen fresco de gatos domésticos recolhido por CT e EE após administração de medetomidina (130-140µg/kg p.v. IM).....	16
Tabela 2 – Parâmetros de qualidade do sémen fresco no gato doméstico recolhido por CT e a partir da cauda do EP utilizando medetomidina (100µg/kg p.v. IM) em associação com cetamina-HCL (5mg/kg p.v. IM).....	17
Tabela 3 – Exemplos de concentração e número total de spz em gatos domésticos obtidos por VA, EE, CT e EP.....	33
Tabela 4 - Resultados individuais para os parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos domésticos, recolhido por CT e a partir do EP, de acordo com o protocolo anestésico utilizado	41
Tabela 5 – Mobilidade total (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	42
Tabela 6 – Mobilidade progressiva (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	43
Tabela 7 – Espermatozóides vivos e morfológicamente normais (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)	44
Tabela 8 – Alterações morfológicas nos spz (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2).....	45
Tabela 9 – Registo da percentagem de spz normais ou com alterações morfológicas numa população de 100% de spz viáveis após coloração de eosina-nigrosina	47
Tabela 10 – Alterações morfológicas dos spz classificadas de acordo com a parte do espermatozóide afectada.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH – Hormona Antidiurética
ALP – fosfatase alcalina
CASA – “Computer-assisted system analysis”
cm – centímetro
CT – cateterização uretral
EE – electroejaculação
EP – epidídimo
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
FSH – Hormona Folículo Estimulante
g – grama
GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
h – horas
HVBV – Hospital Veterinário do Baixo Vouga
IA – Inseminação Artificial
IM – intramuscular
IV - intravenosa
kg – Quilograma
L – litro
LH – Hormona Luteinizante
mg – miligrama
mL – mililitro
mM – milimol
mm – milímetro
 mm^3 – milímetro cúbico
mOSm – miliosmol
NMDA – N-metil-D-aspartato
P1 – protocolo anestésico 1
P2 – protocolo anestésico 2
p.v. – peso vivo
SC – subcutânea
SNC – Sistema Nervoso Central
spz – espermatozóides
U/L – unidades/litro

VA – vagina artificial

V – volts

α – alfa

β – beta

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrómetro

> – superior a

< – inferior a

I – INTRODUÇÃO

A presente dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi possível após a realização do estágio curricular no Hospital Veterinário do Baixo Vouga (HVBV), sob orientação da Doutora Sónia Miranda que ali exerce funções como Directora Clínica e responsável pelos serviços de cirurgia de tecidos moles, ecografia abdominal, endoscopia e reprodução. Realizado no período de 1 de Setembro de 2010 a 31 de Janeiro de 2011, foi sem dúvida uma experiência enriquecedora pois permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do meu percurso académico, possibilitando a aplicação prática desses mesmos conhecimentos em situações reais.

O HVBV, situado na Estrada Nacional 1, nº355, em Águeda, presta serviços clínicos e cirúrgicos a animais de companhia, em horário contínuo das 10 às 20 horas, de segunda a sábado e com um médico veterinário e enfermeiro permanentes 24 horas por dia. É constituído por uma recepção, uma sala de banhos e tosquias, uma zona de pet shop, uma sala com piscina para hidrofisioterapia, três consultórios, uma sala de cirurgia, um laboratório, uma sala de imagiologia com raio X digitalizado, ecografia abdominal e ecocardiografia e quatro zonas de internamento separadas para doenças infecto-contagiosas, cuidados intensivos, cães e gatos. A sala de cirurgia possui dois blocos operatórios e o hospital dispõe ainda de outros meios complementares de diagnóstico como endoscopia. No primeiro piso existe ainda um auditório e uma sala de práticas, com destino a formações.

Para além do acompanhamento a pacientes habituais, o HVBV fornece também um serviço de referência nas várias áreas, recebendo animais encaminhados de todo o território nacional, o que constitui sem dúvida uma mais valia para quem ali estagia.

O estágio decorreu sob um horário rotativo pelos serviços de consulta externa, imagiologia, internamento, anestesia e cirurgia, que abrangeu tanto períodos diurnos como nocturnos, bem como fins-de-semana e feriados, tendo excedido as 500 horas mínimas obrigatórias. O papel do estagiário no HVBV é bastante activo e permite ganhar experiência e prática em diversas situações da actividade clínica. As actividades desenvolvidas consistiram no acompanhamento de casos clínicos, desde o contacto com os proprietários, realização de exame físico, exames complementares, diagnóstico e terapêutica, na participação em diversas intervenções cirúrgicas fazendo a preparação prévia do paciente e assumindo um papel na equipa cirúrgica, como auxiliar de anestesia, circulante ou auxiliar de cirurgião e na realização de procedimentos na área do internamento e cuidados intensivos.

Nos pacientes felinos, as principais causas de internamento foram as afecções do aparelho urinário e do sistema músculo-esquelético. Nos pacientes caninos, as causas de internamento foram mais abrangentes, incluindo afecções ao nível do aparelho gastrointestinal, do sistema músculo-esquelético e do aparelho génito-urinário. Quanto às doenças infecto-contagiosas seguidas, as que apresentaram maior prevalência nos gatos foram a imunodeficiência felina e a leucose felina e nos cães foi a parvovirose. As principais cirurgias presenciadas foram a ovariohisterectomia, orquiectomia, resolução de piómetras, cesariana, mastectomia unilateral total, laparotomia exploratória, remoção de corpo estranho por gastrotomia ou enterotomia e as cirurgias ortopédicas.

Todo o processo de aprendizagem foi facilitado em muito pela excelente equipa do HVBV, que esteve sempre disposta a fornecer explicações, motivação e apoio aos estagiários.

A escolha do tema teve por base o gosto pela área de reprodução e foi feita com o auxílio e após sugestão da Doutora Sónia Miranda.

A presente dissertação de Mestrado será composta por duas partes. A primeira consiste no desenvolvimento do tema, através de uma revisão bibliográfica, à qual se segue a apresentação e discussão dos resultados obtidos após realização da colheita e análise do sémen de gatos domésticos, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DO GATO

O aparelho reprodutor masculino é composto por diversos órgãos individuais, que actuam em conjunto para produzir espermatozóides (spz) e depositá-los no interior do sistema reprodutivo feminino. Para esse fim contribuem tanto o sistema neuroendócrino (hipotálamo e hipófise anterior) quanto o tracto genital. O tracto genital do gato é constituído por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, pelas glândulas sexuais acessórias (próstata e glândulas bulbouretrais) e pelo pénis (Cunningham, 2002).

O testículo encontra-se suspenso dentro do escroto por um cordão espermático e pelo músculo cremáster externo. O escroto, juntamente com os músculos cremásteres, veias e artérias testiculares, protege e termorregula os testículos. Os mecanismos de termorregulação impedem aumentos de temperatura testicular, o que seria prejudicial para a função testicular normal, em especial para a espermatogénese (Cunningham, 2002). Nos gatos, os testículos descem da cavidade abdominal para o escroto através do canal inguinal geralmente antes do nascimento. No entanto, até atingirem a puberdade, movem-se livremente no canal inguinal (Johnston, Root Kustritz & Olson, 2001). Em alguns machos, pode acontecer um ou dois testículos ficarem retidos na cavidade abdominal, o que se designa por criptorquidia. O testículo retido é incapaz de produzir spz normais, devido às elevadas temperaturas a que está sujeito, no entanto, ainda apresenta capacidade androgénica (Cunningham, 2002). No gato, a incidência de criptorquidia varia entre 0,37 e 1,7% consoante os autores (citado por Memon e Tibary, 2001).

O escroto é, essencialmente, uma bolsa constituída por uma camada fibroelástica subcutânea e muscular, denominada *tunica dartos* e revestida externamente por uma fina camada de pele (Cunningham, 2002; England, 2010). Nos gatos, tem localização perineal e é geralmente revestido por pêlos (Dyce, Sack & Wensing 1996).

O testículo é responsável pela produção de spz (espermatogénese) e de hormonas (esteroidogénese), principalmente de androgénios. Essas duas funções realizam-se nos túbulos seminíferos e nas células de Leydig, respectivamente (Cunningham, 2002).

Funcionalmente, consideram-se três compartimentos testiculares, que são profundamente influenciados pelo hipotálamo e hipófise. O compartimento de tecido intersticial, onde se localizam as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, o compartimento basal que contém espermatogónias, que se dividem por mitose e, o compartimento adluminal,

onde os espermatoócitos sofrem diversas transformações até se diferenciarem em spz. Estes dois últimos compartimentos situam-se dentro dos túbulos seminíferos, onde existem também as células de Sertoli, que proporcionam suporte e nutrição para as células germinativas em desenvolvimento (Cunningham, 2002).

Os túbulos seminíferos abrem-se na *rete testis*, que por sua vez transporta os spz juntamente com o líquido tubular seminífero para o epidídimo. Anatomicamente, o epidídimo divide-se em cabeça, corpo e cauda. É, ao longo deste ducto longo e tortuoso que os spz sofrem as fases finais de maturação. A cauda do epidídimo, que desemboca no ducto deferente, funciona tal como este, como local de depósito e armazenamento de spz maduros (Cunningham, 2002).

As glândulas sexuais acessórias presentes no gato são a próstata e as glândulas bulbouretrais, que nesta espécie são de maiores dimensões que a próstata, estando posicionadas craniolateralmente à base do pénis. São responsáveis pela adição de nutrientes e sais e por aumentar o volume do ejaculado (Cunningham, 2002).

O órgão copulatório do macho é o pénis. O pénis felino é pequeno, dirigido caudalmente e com a base revestida de pequenas espículas cornificadas, presentes apenas sob influência da testosterona (Johnston et al., 2001).

2. FISILOGIA REPRODUTIVA DO GATO

2.1. Espermatogénese

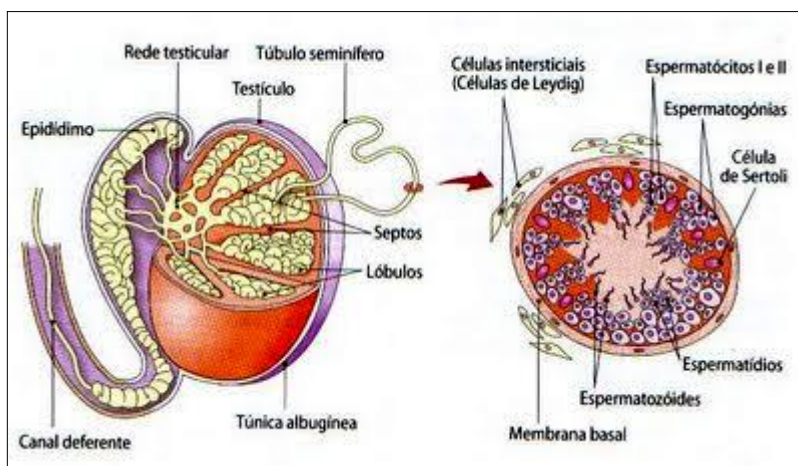
A espermatogénese (Figura 1) é o culminar de uma série de transformações, ao nível dos túbulos seminíferos, que resulta na formação de spz a partir de espermatogónias (células primordiais diplóides). As espermatogónias estão localizadas próximo da membrana basal tubular, e dividem-se por mitose produzindo ciclicamente descendência que sofre divisão meiótica adicional e diferenciação em espermátides haplóides, que são libertadas como spz (Cunningham, 2002; Hewitt, 1998).

No gato adulto, um ciclo completo no epitélio seminífero tem a duração de 10,4 dias. Para que a espermatogénese decorra são necessários aproximadamente 4,5 ciclos, o que apresenta uma duração média de 46,8 dias (França e Godinho, 2003).

A espermatogénese pode ser dividida em três fases: espermatocitogénese (proliferativa e meiótica), espermiogénese e espermiacção (England, 2010).

Figura 1 – Espermatogénese (adaptado de:

<http://blogdebiologia.wordpress.com/2009/10/05/estrutura-dos-testiculos-e-espermatogenese/>)



Na espermatocitogénese, que ocorre no interior do compartimento basal do túbulo seminífero, espermátogonias pouco indiferenciadas, localizadas ao longo da membrana basal dos túbulos multiplicam-se por mitoses. A espermatocitogénese permite tanto a produção de espermátocitos primários como a existência de um “stock” contínuo de espermátogonias, que não proliferam, bastante resistentes às alterações causadas por toxinas e radiação e responsáveis pela capacidade do macho de produzir spz continuamente durante toda a vida adulta (Cunningham, 2002; Hewitt, 1998). É, no compartimento adluminal, que os espermátocitos primários sofrem meiose. Da primeira divisão meiótica resultam células haplóides com cromátides duplicadas, os espermátocitos secundários. Estes sofrem nova divisão meiótica, para produzir espermátides contendo uma cromátide de cada um dos cromossomas haplóides (Cunningham, 2002).

Na espermiogénese, que ocorre no interior do compartimento adluminal, as espermátides recém-formadas sofrem diferenciação em espermátides maduras, que serão libertadas na superfície luminal do túbulo seminífero como spz. Este processo que envolve a libertação de spz é denominado de espermiacção (England, 2010). Na espermiogénese ocorre formação do acrossoma a partir do aparelho de Golgi, condensação e alongamento do núcleo, formação do flagelo e derramamento do citoplasma (Cunningham, 2002).

Estruturalmente, o espermatozóide consiste em cabeça, parte média e cauda. A cabeça contém o material genético que se irá combinar com o do oócito durante a fertilização e, é revestida pelo acrossoma, que contém as enzimas hidrolíticas necessárias à penetração do oócito. A parte intermédia contém mitocôndrias, que fornecem energia necessária para o movimento da cauda, que por sua vez permite o movimento do espermatozóide (Cunningham, 2002).

Embora a espermatogénese ocorra nos testículos, a maturação dos spz só ocorre após estes atravessarem o epidídimo. Com a maturação os spz adquirem potencial de mobilidade, perdem a gota citoplasmática, sofrem alteração de membrana e adquirem capacidade de fertilização. Embora possuam potencial de mobilidade, só na altura em que se misturam com as secreções das glândulas acessórias é que se tornam móveis. No interior do tracto reprodutor da gata, os spz sofrem as últimas alterações, de modo a estarem aptos para poderem fertilizar os óocitos, são elas a capacitação e a reacção do acrossoma (Cunningham, 2002; England, 2010).

O processo de capacitação depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos iões cálcio, de modo a que estes entrem para o espermatozóide e alterem a actividade do flagelo, concedendo-lhe um poderoso movimento de chicote e facilitem a penetração do espermatozóide no óvulo. A saída do colesterol dos spz também é necessária para a capacitação destes e para que a reacção acrossómica possa ocorrer (Guyton & Hall, 2000). A reacção acrossómica é caracterizada pela fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana externa do acrossoma, resultando a formação de vesículas e posterior libertação de enzimas do conteúdo acrossómico, permitindo que o espermatozóide penetre na zona pelúcida (England, 2010).

Só após a puberdade, é que a espermatogénese se inicia. Até então, os túbulos seminíferos são constituídos por espermatogónias relativamente pouco indiferenciadas e por células de Sertoli imaturas. À medida que a puberdade se aproxima, o número e a complexidade das células de Sertoli aumenta, assim como o número de mitoses (Noakes, Parkinson & England, 2001).

2.2. Esteroidogénese

O aparelho reprodutor masculino é regulado pelo hipotálamo, que sintetiza e secreta de modo pulsátil, a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), que age directamente sobre as células gonadotróficas na hipófise anterior, sintetizando e secretando as gonadotrofinas – a hormona folículo estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). A libertação destas gonadotrofinas depende do padrão pulsátil de secreção da GnRH, isto é, pulsos de alta frequência promovem a libertação de LH enquanto, que pulsos irregulares e de baixa amplitude provocam a libertação de FSH (Cunningham, 2002).

Nas células de Leydig existem receptores de membrana aos quais se liga a LH que estimula a conversão de colesterol em testosterona. A testosterona, assim como os seus metabolitos activos, estrogénios e diidrotestosterona, regulam a síntese e a secreção de LH por “feedback”

negativo exercido no hipotálamo ou na hipófise anterior (Cunningham, 2002). A testosterona é necessária ainda, para o início e manutenção da espermatogénese, para a manutenção das actividades de secreção e absorção dos ductos eferentes, epidídimo e canal deferente, para o crescimento e manutenção da próstata, para a manutenção da libido e para o desenvolvimento de características sexuais secundárias (Feldman & Nelson, 2004). Dentro dos testículos, as células alvo para a testosterona são as células mióides peritubulares e as células de Sertoli (Cunningham, 2002).

Nas células de Sertoli estão presentes receptores para a FSH e possivelmente também nas espermatogónias dentro dos túbulos seminíferos. A FSH estimula então a espermatogénese indirectamente pela acção das células de Sertoli sobre as células germinativas (Hewitt, 1998). A secreção de FSH é estimulada pela GnRH e inibida pela inibina, uma glicoproteína não-esteróide secretada pelas células de Sertoli (Feldman & Nelson, 2004).

2.3. Comportamento Reprodutivo do Gato

De acordo com Traas (2010), a puberdade no gato pode ser definida como a altura em que este é capaz de demonstrar comportamento sexual normal e de produzir quantidade suficiente de spz normais para originar descendência.

Nos gatos, por volta das 20 semanas de idade, aparecem as primeiras evidências histológicas de espermatogénese. Os spz estão presentes quando o peso dos dois testículos excede 1g. A idade em que se inicia a puberdade situa-se em média entre os 8 e os 10 meses de idade ou quando os animais atingem 2,5kg de peso vivo (p.v.) e depende da condição física, do peso corporal do animal e da altura do ano (Johnston et al., 2001).

Nesta espécie, a ovulação é induzida pela cópula. A ovulação ocorre devido à estimulação dos receptores neuro-mecânicos vaginais pelas espículas penianas, que transmitem informação ao hipotálamo para que este produza GnRH, que por sua vez age sobre a hipófise estimulando a libertação de LH. A LH é responsável pela indução da ovulação, que geralmente ocorre 26 a 29 horas (h) após a cópula (Linde-Forsberg & Axné, 1998; da Silva, 2008).

Algumas espécies de animais apresentam um período de repouso sexual sazonal de duração e intensidade variável. Esta sazonalidade está directamente relacionada com o número de horas de luz diária (fotoperíodo) a que os animais são expostos e é visível nas áreas geográficas onde se verificam grandes flutuações na duração do dia durante o ano (Stornelli et al., 2004). Na gata, a sazonalidade éstrica e ovárica encontra-se bem estudada e, apesar de ser bastante influenciada pela latitude e pela raça, a duração do número de horas de luz por dia é o

principal responsável pelo início e duração da mesma. Nas zonas temperadas do Norte, a época reprodutiva tem início no mês de Janeiro ou Fevereiro e termina entre Junho e Novembro (Feldman & Nelson, 2004). A melatonina, hormona produzida pela glândula pineal em resposta à escuridão, controla a capacidade reprodutiva do animal segundo a estação do ano (Cunningham, 2002). No gato, também a produção espermática apresenta evidências de ser influenciada pelo fotoperíodo, sendo maior à medida que aumenta a exposição à luz solar. Segundo um estudo realizado por Stornelli et al. (2004), a quantidade de luz diária influencia o número de spz recuperados a partir da cauda do epidídimo, sendo que o número de spz é significativamente maior à medida que se aumenta o número de horas de exposição à luz diária. Os animais submetidos a orquiectomia foram divididos em três grupos segundo o número de horas de luz diária a que foram expostos. Os resultados obtidos foram de $18,92 \pm 1,62 \times 10^6$ spz para 10h de luz, $25,44 \pm 4,03 \times 10^6$ spz para 11h30 minutos de luz e de $33,97 \pm 2,57 \times 10^6$ spz para 13h de luz (Stornelli et al., 2004). A concentração é influenciada pelo aumento da luminosidade diária sendo maior em amostras colhidas na Primavera do que no Inverno. Para além da concentração, o número de horas de luz diária afecta também a qualidade dos spz sendo a percentagem de spz vivos significativamente superior em amostras colhidas em dias com mais de 11h de luz. Histologicamente, a nível testicular, podemos observar uma maior percentagem de células de Leydig e de túbulos seminíferos com abundantes espermátides maduras durante as épocas do ano em que os dias apresentam maior número de horas de luz. Estes resultados indicam que existe sazonalidade na produção espermática do gato, o qual parece apresentar uma estação reprodutiva similar à da gata (Reyna et al., 2005a,b; Reyna et al., 2006a,b).

3. IMPORTÂNCIA DA COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÉMEN DE GATOS DOMÉSTICOS

Na última década, a colheita e posterior avaliação de sémen de gato doméstico têm estado na origem de diversas investigações, não só devido ao crescente interesse dos investigadores pela reprodução do gato doméstico como também pelo seu uso como modelo experimental para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas a fim de serem utilizadas em programas de conservação de espécies felinas ameaçadas de extinção (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Stornelli, 2007).

A colheita de sémen possibilita a aquisição de material genético para uso na clínica reprodutiva, na biotecnologia da reprodução e na investigação. É necessária quando se pretende investigar situações de subfertilidade ou infertilidade de um macho, para confirmação de espermatogénese normal em machos jovens antes de iniciarem a sua vida reprodutiva, para avaliar a produção de sémen após doenças sistémicas ou terapêuticas medicamentosas, para o diagnóstico de doenças que envolvam o tracto reprodutivo, antes da realização de uma Inseminação Artificial (IA) quer seja com sémen fresco ou criopreservado e antes da conservação (refrigeração ou congelação) do mesmo, para estimar a sua capacidade de fertilização (Fagundes, Moura, Oliveira & da Silva Jr, 2010; Stornelli, 2007).

Num paciente com doença infecciosa bacteriana do aparelho genital, a colheita e posterior análise bacteriológica do sémen permite-nos isolar o agente etiológico e implementar uma antibioterapia específica mediante a realização de um antibiograma (Stornelli, 2007).

Tanto a colheita de sémen como a IA em gatos foram descritas pela primeira vez há mais de 30 anos, no entanto, ainda não são utilizadas rotineiramente na prática clínica. Técnicas mais avançadas de biotecnologia como a fertilização *in vitro*, a injeção intracitoplasmática de spz e a clonagem têm sido realizadas experimentalmente com sucesso no gato mas sem qualquer aplicabilidade na prática clínica (Axnér & Linde-Forsberg, 2002).

Devido ao comportamento impróprio dos machos inteiros dentro de uma casa, como por exemplo a vocalização excessiva e a marcação de território, a orquiectomia é na maioria das vezes inevitável, o que conduz a uma diminuição da variabilidade genética dentro da própria raça, obrigando os criadores a recorrerem com mais frequência a técnicas de reprodução assistida. Assim sendo, a utilização de sémen criopreservado recolhido de machos considerados geneticamente valiosos, permite o armazenamento do material genético recolhido por tempo indeterminado e o seu transporte por longas distâncias (Axnér & Linde-Forsberg, 2002).

A IA está indicada em situações de incompatibilidade física ou comportamental entre animais e permite ultrapassar problemas de agressividade naturais da espécie. Com a IA é possível ainda ultrapassar barreiras geográficas e aumentar a diversidade genética. Adicionalmente, existe redução do risco de transmissão de doenças infecciosas durante a cópula (Luvoni, Kalchschmidt, Leoni & Ruggiero, 2003). Embora este risco seja reduzido pela IA, existem vírus, como por exemplo o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), que se transmite a partir do sémen fresco, podendo o macho infectar a fêmea mesmo na ausência de cópula. Se o

sémen utilizado na IA for sémen congelado, não existe transmissão horizontal do FIV (Jordan et al., 1996).

O sémen utilizado para IA pode ser fresco, refrigerado ou congelado. No que diz respeito ao sémen refrigerado, não existem estudos relativos à sua utilização em IA (Tsutsui, 2006). Quando utilizado sémen congelado em alternativa ao sémen fresco, as taxas de concepção obtidas por IA são piores e é necessária uma maior quantidade de spz para a mesma técnica de inseminação (Tsutsui et al., 2000a,b; Tsutsui, 2006). Isto porque, durante o processo de congelação/descongelação do sémen, as membranas plasmáticas e acrossomais sofrem danos, uma vez que são extremamente sensíveis a este processo (Villaverde & Lopes, 2007).

A deposição de sémen na IA pode ser realizada na vagina, no útero ou no oviducto sendo que, consoante o local de inseminação, varia o número de spz necessários à concepção (Tsutsui, 2006). A IA intravaginal é a maneira mais fácil de inseminar uma gata e, geralmente, não requer anestesia. O sémen é depositado no interior da porção cranial da vagina, o mais próximo possível do cérvix, com o auxílio de um catéter uretral estéril e, após a inseminação a gata deve ficar com os posteriores elevados durante 10 minutos (Linde-Forsberg & Axné, 1998; Malandain, 2005). No entanto, existem evidências de que as taxas de concepção são melhores mediante deposição do sémen no útero, sendo a quantidade de spz necessária bastante inferior à utilizada na IA vaginal (Tanaka et al., 2000; Tsutsui et al., 2000a; Tsutsui, 2006). A IA intrauterina pode ser realizada por intermédio de laparoscopia, laparotomia ou cateterização trans-cervical (Malandain, 2005). Tsutsui, Tanaka e Hori (2001) mencionam que para se obter uma taxa de concepção de 25% mediante deposição de sémen fresco no oviducto, por laparotomia, a quantidade de spz necessária é de 2×10^6 e que com 4×10^6 spz a taxa de concepção obtida é de 43%. A deposição de 5×10^3 ou 5×10^5 spz no oviducto não se traduziu em concepção (Tsutsui et al., 2001). Para se obter uma taxa de concepção de 80% mediante deposição de sémen fresco directamente no útero, o número de spz necessário é de 8×10^6 , sendo a taxa de concepção de 13% e 31% para 2×10^6 e 4×10^6 spz, respectivamente (Tsutsui et al., 2000a). De acordo com estes dados, Tsutsui (2006) afirma que o número de spz necessário para concepção por deposição de sémen fresco no oviducto via laparoscópica é semelhante ao número de spz necessário para concepção por IA intrauterina.

4. TÉCNICAS DE COLHEITA DE SÉMEN

Antes da colheita de sémen é essencial proceder-se à recolha de dados para a realização da história clínica e reprodutiva do macho assim como à execução do exame físico dando especial importância ao aparelho reprodutor. A informação obtida deve ser o mais detalhada possível, tendo em atenção aspectos como a idade (animais velhos apresentam geralmente diminuição da libido e da qualidade do sémen), raça (a presença de endogamia frequente em animais com pedigree conduz a uma diminuição da variação genética, que pode estar associada a um aumento de spz morfologicamente anormais), tipo de dieta, sinais ou sintomas de doença clínica, existência de medicação recente, libido, cópula normal, número e tamanho das ninhadas e taxa de sucesso reprodutivo, entre outros. Podem ser causa de infertilidade as doenças infecciosas do gato ou do gatil, sendo que as doenças virais são mais comuns do que as bacterianas e, estas últimas, estão frequentemente relacionadas com a falta de higiene e a sobrepopulação (Zambelli & Levy, 2010).

A colheita de sémen constitui uma das principais dificuldades na espécie felina. Nos outros mamíferos, a colheita de sémen é normalmente realizada mediante estimulação manual ou através do uso de vagina artificial. O uso de vagina artificial (VA) nos gatos é uma técnica exequível, com excelentes resultados. No entanto, não é um método prático devido ao temperamento e comportamento da espécie além de que, requer treino prévio, somente bem sucedido em 60 a 70% dos casos e, na maioria das vezes é necessária a presença de uma fêmea em estro ou castrada sob efeito de estrogénios exógenos (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Fagundes et al., 2010; Verstegen-Onclin & Verstegen, 2006; Zambelli & Cunto, 2006). A estimulação manual é impraticável no gato devido ao pequeno tamanho do pénis (Malandain, 2005).

A técnica de colheita de sémen com VA foi descrita pela primeira vez em 1970. Com este método não é necessário o recurso a contenção física ou química, um só técnico é suficiente para a realização da colheita e, por último, é um método pouco dispendioso devido ao baixo custo da VA (Zambelli & Cunto, 2006). Se o gato for colocado num ambiente desconhecido para realização da colheita de sémen, mesmo sendo treinado, é provável que não aceite a VA (Axnér & Linde-Forsberg, 2002).

A VA poder ser executada seccionando e adaptando uma pequena pompete de borracha para pipetas de Pasteur a um eppendorf sem tampa ou a um tubo de pequeno tamanho (Axnér &

Linde-Forsberg, 2002). A VA é introduzida numa garrafa de polietileno de 60mL contendo água a 52°C, permitindo uma temperatura interna de trabalho de 44 a 46°C (Johnston et al., 2001). Em alternativa ao uso da garrafa, Stornelli (2007) menciona o uso de uma VA pré-aquecida a 36°C para a recolha de sémen. Quando a garrafa é utilizada, o cuidado deve ser redobrado no momento em que se retira a VA da garrafa, para que não ocorra contaminação do sémen com água (da Silva, 2008). A colheita do ejaculado demora entre 1 a 4 minutos e é realizada colocando a VA sobre o pénis erecto do gato, no momento em que ele monta a fêmea (Zambelli & Cunto, 2006).

Zambelli e Cunto (2006) referem um estudo em que foram realizadas três colheitas de sémen por VA, por semana no mesmo gato e se obtiveram volumes e números de spz constantes. Quando, a recolha foi realizada diariamente, a partir do quarto dia, verificou-se uma redução do volume e do número de spz para menos de metade da primeira contagem, mantendo-se a partir daí o número de spz constante (14-45 milhões de spz por ejaculado) (Zambelli & Cunto, 2006). Isto sugere que após quatro dias de ejaculação diária as reservas existentes se esgotam. A partir do quarto dia, o número de spz obtido foi o equivalente à produção espermática diária (Johnston et al., 2001). Parâmetros como a mobilidade, viabilidade, formas anormais e libido sexual não sofreram variações em relação aos tempos de colheita. No entanto, no que diz respeito ao número de formas imaturas verificou-se um aumento com a recolha diária (Zambelli & Cunto, 2006).

A técnica de colheita de sémen por electroejaculação (EE), também descrita pela primeira vez em 1970, é actualmente considerada como método de eleição para recolha de sémen em gatos (Zambelli & Cunto, 2006). Para a sua realização é necessário equipamento específico (um estimulador eléctrico conectado a uma sonda rectal), dispendioso, autorização específica por parte do Comité de Ética e anestesia geral para evitar desconforto ao gato (Filliers et al., 2010; Linde-Forsberg & Axné, 1998). Esta técnica só deve ser praticada em animais saudáveis, para os quais existe um risco anestésico mínimo (Stornelli, 2007). Diferentes protocolos anestésicos têm sido descritos para a recolha de sémen por EE. Axné e Linde-Forsberg (2002) referem o uso de medetomidina (Domitor® vet.) 80µg/kg de p.v. subcutânea (SC) em combinação com cetamina-HCL (Ketalar®) 5mg/kg de p.v. intramuscular (IM) para anestesiarem os gatos, permitindo tempo suficiente para a recolha de sémen segundo o protocolo de estimulação abaixo descrito e, geralmente, para a repetir após 5 e 10 minutos. Contudo, o anestésico utilizado com mais frequência é a cetamina-HCL isolada, na dose de 25-33mg/kg de p.v. IM ou em combinação com a medetomidina nas doses acima referidas (Zambelli &

Cunto, 2006). Outros anestésicos utilizados em combinação com a cetamina-HCL incluem a xilazina, o diazepam, os derivados fenotiazínicos como por exemplo o maleato de acepromazina, os anestésicos inalatórios como o isoflurano ou o halotano e ainda o propofol (Chatdarong, Ponglowhapan, Manee-in & Pongphet, 2006; Zambelli, Cunto, Prati & Merlo, 2007). Recentemente, a medetomidina foi utilizada isoladamente 130-140µg/kg de p.v. IM para a colheita de sémen por EE e resultou numa boa restrição farmacológica para a recolha, num maior número de spz por ejaculado e numa maior concentração em comparação com a administração isolada de cetamina na dose de 20mg/kg de p.v. IM, sem se verificar um aumento da percentagem de fluxo retrógrado de sémen para a bexiga. A administração de medetomidina nas doses acima referidas resultou num maior número de spz lançados para a uretra. Isto pode ser explicado pela acção dos agentes adrenérgicos nos alfa(α)-adrenoreceptores que provocam a contracção dos vasos deferentes e participam na contracção do trígono e esfíncter da bexiga durante a ejaculação (Zambelli et al., 2007).

Para a realização da técnica por electroejaculação, após evacuação das fezes, a ponta da sonda é lubrificada e introduzida cerca de 7 a 9cm no recto, com os respectivos eléctrodos localizados ventralmente. O pénis é exteriorizado e colocado dentro de um pequeno tubo para onde é recolhido o sémen (Linde-Forsberg & Axné, 1998). Embora existam vários protocolos de estimulação descritos, o mais utilizado segundo Axné e Linde-Forsberg (2002), é o referido por Howard, Brown, Bush e Wildt (1990). Este protocolo consiste num total de 80 estímulos eléctricos, com voltagens compreendidas entre 2 e 5 volts (V). Os estímulos dividem-se em três séries (30;30;20) com um período de repouso de 2 a 3 minutos entre cada série. A primeira série é composta por 10 estímulos de 2V, 10 de 3V e 10 de 4V; a segunda série é composta por 10 estímulos de 3V, 10 de 4V e 10 de 5V e a terceira série é composta por 10 estímulos de 4V e 10 de 5V. Cada estímulo demora aproximadamente 1 segundo para ir de 0V até à voltagem desejada, 2 a 3 segundos na voltagem desejada, sofrendo de seguida uma descida repentina da voltagem desejada para 0V, onde permanece por cerca de 3 segundos (Howard et al., 1990). Se o estímulo for o adequado, o gato responde com extensão rígida dos membros posteriores. Se forem utilizadas voltagens de 2V ou superiores e não existir resposta, isto significa que os eléctrodos não estão colocados na posição correcta no recto ou existe interferência por fezes (Axné & Linde-Forsberg, 2002).

Nos ejaculados recolhidos por EE, o número de spz presente depende da voltagem de estimulação e do número de estímulos eléctricos utilizados. Quando se utilizaram 4 ou 8V os ejaculados apresentaram maior número de spz do que com 1 ou 2V, existindo por vezes a 8V

contaminação do sémen por urina. Com uma maior voltagem existe uma maior emissão de secreções provenientes das glândulas acessórias. A voltagem não afecta a mobilidade nem a viabilidade dos spz (Zambelli & Cunto, 2006).

Sémen recolhido por EE apresenta maior volume mas menor concentração espermática do que se for recolhido por VA (Stornelli, 2007). A osmolalidade não é afectada pelo método de colheita ou pelo gato ao contrário do pH, que é superior em amostras obtidas por EE do que por VA. Estes aumentos de alcalinidade e de volume podem ser explicados pelo aumento do contributo das glândulas sexuais acessórias, devido à estimulação eléctrica na EE (Zambelli & Cunto, 2006).

Axnér, Ström e Linde-Forsberg (1997) realizaram um estudo em que foram efectuadas duas colheitas de sémen por EE no mesmo gato com 5-10 minutos de intervalo entre elas e, concluíram que o primeiro ejaculado apresenta uma quantidade significativamente superior de gotas citoplasmáticas distais, caudas enroladas e spz imóveis do que o segundo. Embora o segundo ejaculado contenha maior proporção de spz normais, o número de spz é bastante inferior ao obtido no primeiro ejaculado. A maior proporção de spz com alterações morfológicas e menor mobilidade no primeiro ejaculado do que no segundo é, provavelmente, devido ao envelhecimento dos spz no epidídimo.

A recolha de sémen a partir da cauda do epidídimo (EP) representa uma alternativa prática para a obtenção de sémen de boa qualidade para fertilização *in vitro*, em laboratórios em que não existe acesso ao equipamento ou animais requeridos para a realização dos dois métodos anteriormente descritos (Filliers et al., 2010). É um método utilizado para a recolha de sémen para criopreservação, em animais domésticos ou silvestres, de grande estima ou elevado valor genético, após morte ou orquiectomia (Stornelli, 2007). Os spz obtidos por esta técnica são morfolologicamente viáveis, capazes de sofrer a reacção de capacitação, de se ligarem à zona pelúcida e com poder de fertilização (Martins, 2007). Este método de colheita apresenta contudo uma grande desvantagem, não pode ser repetido no mesmo animal (Zambelli & Cunto, 2006).

Após a orquiectomia, os dois testículos e respectivos epidídimos são recolhidos e colocados numa solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% suplementada com 50µg/mL de gentamicina. A cauda do EP é então separada do respectivo testículo, repetidamente cortada numa placa de Petri contendo o meio Hepes-TALP e colocada numa estufa convencional a 39°C durante 20 minutos para permitir a dissipação dos spz passivamente para o meio (Filliers et al., 2010). Outros meios comprovados para a recuperação de spz a partir do EP são a solução de Ringer,

sem lactato (Villaverde, Martins, Castro & Lopes, 2006) e a solução fisiológica a 0,9% referida por Martins (2007).

Axnér, Ström Holst e Linde-Forsberg (1998) realizaram um estudo que tinha como objectivo determinar a proporção de spz anormais na cauda do EP e verificar se a electroejaculação afecta ou não essa proporção. Para isso foram realizada duas colheitas a partir da cauda do EP, uma antes e outra após a electroejaculação, sem que se verificassem diferenças significativas entre as duas. Estudaram ainda a proporção de spz morfologicamente anormais no epidídimo em comparação com os do ejaculado. Relataram que os spz provenientes do ejaculado apresentavam maior percentagem de anomalias da cauda e sugeriram que essas alterações eram provocadas pela técnica de colheita. A gota citoplasmática distal foi a alteração mais frequentemente encontrada em spz provenientes da cauda do epidídimo e provavelmente está relacionada com o processo de maturação espermática durante a sua passagem pelo epidídimo. Presume-se que durante a ejaculação o espermatozóide perca este vestígio citoplasmático.

Recentemente, foi descrita uma nova técnica de colheita de sémen em gatos por cateterização uretral (CT), sem recurso à estimulação eléctrica, após administração de medetomidina na dose de 130 a 140µg/kg p.v. IM. Esta técnica contorna várias das dificuldades atrás mencionadas e permite obter sémen de boa qualidade. Este novo método de colheita parece ter utilidade na prática e, em comparação com a EE, é caracterizado por maiores concentrações, menores volumes totais e menores valores de pH (Tabela 1). Conforme já foi referido anteriormente, na EE, devido à estimulação eléctrica, existe um aumento do contributo das glândulas sexuais acessórias, que pode justificar as diferenças encontradas no volume e no pH dos ejaculados recolhidos por estes dois métodos. Neste estudo, só foram utilizados gatos com valores de mobilidade espermática superior a 50% (Zambelli, Prati, Cunto, Iacono & Merlo, 2008).

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade do sémen fresco de gatos domésticos recolhido por CT e EE após administração de medetomidina (130-140µg/kg p.v. IM) (adaptado de: Zambelli et al., 2008)

1\2	Vol(µL)	pH	TM(%)	FPM	Viab(%)	NA(%)	Conc(10⁶/mL)	TNS(10⁶)
CT	10,5±5,3	7,0±0,4	78,1±9,6	4,7±0,5	80,0±10,1	93,6±3,4	1868,4±999,8	21,0±18,1
EE	67,1±25,9	7,9±0,4	78,1±10,3	4,5±0,5	81,4±9,6	92,4±3,3	542,9±577,9	33,6±34,5

1-Técnicas de recolha de sémen; 2-Parâmetros de qualidade do sémen; Vol= volume; TM= mobilidade total; FPM= velocidade dos movimentos progressivos, avaliada numa escala de 0 a 5; Viab= viabilidade; NA= acrossomas normais; Conc= concentração; TNS= número total de spz.

Para a colheita de sémen por CT, um catéter urinário com 1mm de diâmetro e 11cm de comprimento é cortado na ponta de modo a eliminar as aberturas laterais e inserido aproximadamente 9cm na uretra, de modo a atingir a uretra prostática e com cuidado para não alcançar a bexiga. Posteriormente, o catéter é retirado da uretra a fim de colher o sémen aí libertado (Zambelli et al., 2008).

Filliers et al. (2010) compararam pela primeira vez os parâmetros de qualidade do sémen fresco recolhido por CT e a partir da cauda do EP no mesmo gato. Para a orquiectomia os gatos foram submetidos a um protocolo anestésico com medetomidina (Domitor®) 100µg/kg de p.v. IM em combinação com cetamina-HCL (Anesketin®) 5mg/kg de p.v. IM. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de qualidade do sémen fresco no gato doméstico recolhido por CT e a partir da cauda do EP utilizando medetomidina (100µg/kg p.v. IM) em associação com cetamina-HCL (5mg/kg p.v. IM) (adaptado de: Filliers et al., 2010)

1	2	Cauda do EP	CT
MOT		71,5±9,0	50,4±20,3
PMOT		50,0±12,4	30,5±18,3
N		58,1±16,6	41,5±18,5
AH		9,9±14,0	4,4±2,8
AT		10,5±7,4	39,5±17,2
PPD		10,3±5,2	6,8±8,0
DPD		10,5±8,3	7,7±7,9
AI		74,5±6,6	84,2±6,8
LIVE		82,2±18,4	84,4±11,0

1-Parâmetros de qualidade do sémen; 2-Técnicas de recolha; MOT= % mobilidade; PMOT= % mobilidade progressiva; N= % spz normais; AH= % de cabeças anormais; AT= % caudas anormais; PPD= % gota citoplasmática proximal; DPD= % gota citoplasmática distal; AI= % spz com acrossoma intacto; LIVE= % spz com membrana plasmática intacta.

A ejaculação retrógrada para a bexiga no gato doméstico é frequentemente observada, com valores compreendidos entre os 15 e os 90%, sendo considerada como componente natural do processo ejacutório e não induzida pela técnica de recolha (Stornelli, 2007; Zambelli, 2007). Para determinar se o gato produz spz, pode-se utilizar a técnica de recuperação de spz a partir da bexiga (Stornelli, 2007).

A obtenção de sémen mediante lavagem da vagina da fêmea logo após a cópula constitui uma alternativa quando a VA ou a EE não podem ser utilizadas e permite obter algumas informações sobre o sémen do reprodutor. Para a realização da lavagem vaginal é utilizada uma solução fisiológica salina a 37°C, e a fêmea deve ser anestesiada. A lavagem vaginal com 1mL de solução fisiológica permite obter entre 40×10^4 e 10×10^6 spz (Stornelli, 2007).

5. BREVE DESCRIÇÃO FARMACOLÓGICA DA MEDETOMIDINA E DA CETAMINA

Na literatura veterinária, métodos farmacológicos para induzir a erecção e a ejaculação têm sido descritos em diferentes espécies (Zambelli et al., 2008).

No cavalo, o uso de agonistas α -2-adrenérgicos parece estimular a erecção do pénis e a ejaculação (Zambelli et al., 2008). Os ejaculados assim obtidos têm baixo volume e alta concentração espermática (Zambelli et al. 2007; 2008).

Em rinocerontes brancos, a influência dos agentes α -adrenérgicos está principalmente relacionada com a duração da erecção do pénis (Zambelli et al., 2008).

Nos homens com aspermia (ausência de ejaculado), a administração de α -adrenérgicos tem sido utilizada para provocar a ejaculação anterógrada enquanto que em cães, o uso de agentes α -2-adrenérgicos em associação com antagonistas dos receptores beta(β)-adrenérgicos conduz ao aumento da produção de spz (Zambelli et al., 2007; 2008).

No gato doméstico, a administração de agentes α -adrenérgicos geralmente não induz ejaculação, sendo apenas responsável pela libertação de spz na uretra (Zambelli et al., 2007). Em gatos domésticos, a administração de medetomidina (agonista α -2-adrenérgico) com vista à recolha de sémen por CT não induziu a erecção nem ejaculação (Zambelli et al. 2008).

Conforme referido anteriormente, os agentes α -adrenérgicos levam à contracção das células musculares dos ductos deferentes e contribuem para a contracção do trígono e esfíncter da bexiga urinária durante a ejaculação (Zambelli et al., 2007; 2008).

Também já foi referido nesta dissertação, que para a recolha de sémen por EE, o anestésico mais utilizado é a cetamina-HCL, em associação com outros fármacos como a medetomidina ou isoladamente (Zambelli & Cunto, 2006).

5.1. Medetomidina

A medetomidina pertence à classe dos agonistas α -2-adrenérgicos. Estes agentes podem ser classificados como sedativos/hipnóticos e apresentam simultaneamente propriedades analgésicas e de relaxantes musculares. São bastante utilizados para a contenção química e pré-medicação em grandes e pequenos animais. A intensidade e duração da sedação e da analgesia estão relacionadas com a dose administrada (Pawson, 2002).

Receptores α -2-adrenérgicos estão presentes tanto a nível central como periférico, nas membranas pré e pós-sinápticas (Pawson, 2002). Causam depressão pela estimulação dos receptores α -2 pré-sinápticos o que conduz a uma diminuição da libertação de norepinefrina central e periférica. Como resultado dessa acção, verifica-se uma diminuição da actividade simpática do Sistema Nervoso Central (SNC), e uma diminuição da circulação de catecolaminas e de outras hormonas relacionadas com o stress (Cortopassi & Fantoni, 2002; Muir, Hubbell, Skarda & Bednarski, 2000). Os efeitos dos agonistas α -2-adrenérgicos no SNC incluem sedação, hipnose, relaxamento muscular, ataxia e analgesia, principalmente visceral (Cortopassi & Fantoni, 2002).

Em veterinária, os agonistas α -2 não são verdadeiramente específicos para os receptores α -2 sendo que, a maioria exerce também efeito sobre os receptores α -1. A medetomidina é o agonista α -2-adrenérgico que apresenta maior selectividade para os receptores α -2, com um rácio α 2: α 1 de 1620:1 (Muir et al., 2000; Pawson, 2002).

Os efeitos dos agonistas α -2 podem ser antagonizados pelos antagonistas de receptores α -2-adrenérgicos (como por exemplo a ioimbina, tolazolina e atipamezol), o que permite uma recuperação anestésica mais rápida. O doxapram, embora não seja um antagonista específico, é útil para reverter a depressão respiratória e a sedação leve (Muir et al., 2000; Pawson, 2002). Os efeitos cardiovasculares incluem a diminuição da frequência cardíaca devido à redução do tónus simpático do SNC e ao aumento da actividade parassimpática. A bradicardia pode muitas vezes ser acompanhada de alterações no ritmo cardíaco. Também podem ocorrer arritmias sinusais, bloqueios sinoatriais ou bloqueios atrioventriculares de primeiro, segundo e até de terceiro grau (Muir et al., 2000; Pawson, 2002).

Pode existir redução do débito cardíaco entre 30 a 50% e, geralmente, coincide com a redução da frequência cardíaca e o aumento da resistência vascular periférica (Muir et al., 2000).

A activação dos receptores α -1 e α -2 pós-sinápticos periféricos induz vasoconstrição. Em contraste, a activação de receptores α -2 pré-sinápticos centrais e periféricos provoca vasodilatação, devido à diminuição da libertação de norepinefrina pelos terminais nervosos simpáticos e à diminuição do tónus simpático. Após a administração do fármaco, observa-se um período de hipertensão como consequência da vasoconstrição inicial, ao qual se segue um período de ligeira hipotensão. A duração da fase hipertensiva é bastante variável, sendo influenciada pelo fármaco utilizado, pela dose e pela via de administração. É mais evidente se o fármaco for administrado por via intravenosa (IV) e se forem utilizadas doses elevadas (Pawson, 2002).

No sistema respiratório, os agentes α -2 agonistas provocam uma depressão respiratória dependente da dose. Nos primeiros minutos após a administração, é frequente ocorrer aumento da pressão parcial de dióxido de carbono ou diminuição da pressão parcial de oxigénio. Provocam ainda diminuição da frequência respiratória e do volume-minuto (volume de ar renovado por minuto) sobretudo quando o fármaco é administrado em doses elevadas por via IV ou mesmo IM (Cortopassi & Fantoni, 2002).

A nível gastrointestinal é frequente a ocorrência de vômito, especialmente em gatos, após a administração de agonistas α -2-adrenérgicos por via IM. Estes agentes farmacológicos diminuem a salivação, a secreção gástrica e a motilidade gastrointestinal, reduzem o reflexo de deglutição e prolongam o tempo de trânsito intestinal (Pawson, 2002; Muir et al., 2000).

Os α -2 agonistas actuam ao nível do sistema endócrino promovendo uma diminuição da libertação de insulina e da hormona antidiurética (ADH). Suprimem a libertação de insulina por estimulação de receptores α -2 pré-sinápticos nas células β do pâncreas, o que resulta em hiperglicémia e glicosúria. Promovem ainda a diurese, com aumento da excreção de água e de sódio. Esta ocorre principalmente como consequência da diminuição da libertação da ADH (Muir et al., 2000; Pawson, 2002). Podem provocar aumento da tonicidade uterina e sabe-se que atravessam a placenta. No entanto, não provocam aborto em fêmeas gestantes, nem foram observados efeitos sobre a gestação ou o parto (Cortopassi & Fantoni, 2002; Muir et al., 2000).

Os agentes α -2 agonistas são lipossolúveis, o que facilita a sua distribuição e absorção. A medetomidina é bastante lipofílica, com um volume de distribuição de 3,5L/kg no gato (Pawson, 2002).

Estes fármacos devem ser administrados por via IV ou IM. Quando administrados por via IV geralmente actuam entre 3 a 5 minutos após a administração. No caso de a administração ser IM, podem demorar entre 10 a 15 minutos para alcançar pleno efeito. A absorção do fármaco pela via SC é bastante variável, não sendo esta recomendada (Pawson, 2002).

Quanto à duração da acção esta é variável consoante o α -2 agonista utilizado. A medetomidina apresenta uma duração de acção superior à da xilazina, cerca de 60 a 90 minutos e de 30 a 40 minutos, respectivamente. No entanto, tanto para a medetomidina como para a xilazina, a recuperação completa pode demorar várias horas (Pawson, 2002). Os fármacos pertencentes ao grupo dos agonistas α -2 adrenérgicos são biotransformados pelo fígado e excretados pela urina (Muir et al., 2000).

A medetomidina tem uma semi-vida aproximada de 0,97 a 1,6h, sendo rapidamente eliminada (Zambelli et al., 2007).

Fármacos deste grupo estão contra-indicados em pacientes com doenças do miocárdio ou reserva cardíaca reduzida, hipotensão e choque, doença respiratória, insuficiência hepática, doença renal, diabetes *mellitus*, pacientes debilitados e na gravidez (Pawson, 2002).

Nos gatos, assim como em outras espécies, quando se administra a medetomidina em associação com a cetamina (anestésico dissociativo), verifica-se que os α -2 agonistas contrariam a rigidez muscular induzida pela cetamina e promovem uma recuperação anestésica mais suave. Por sua vez, as propriedades simpaticomiméticas da cetamina compensam alguns dos efeitos cardiovasculares (como a bradicardia) indesejáveis dos α -2 agonistas. As associações de medetomidina com cetamina induzem curtos períodos de anestesia e de imobilização (Lemke, 2003; Pawson, 2002).

A utilização de atropina ou glicopirrolato como pré-medicação previne a bradicardia. No entanto, estes fármacos podem ser responsáveis por aumentar a hipertensão inicial provocada pela administração da medetomidina. Quando a medetomidina é associada a um opiáceo ou uma benzodiazepina verifica-se um aumento do efeito analgésico e sedativo (Lemke, 2003).

5.2. Cetamina

Em 1963, surgiu a cetamina, em substituição da fenciclidina, com o propósito de produzir menor intensidade de reacções adversas (Valadão, 2002). Pertence à classe dos anestésicos dissociativos e é destes, o fármaco menos potente e o mais frequentemente utilizado para na anestesia de animais (Lin, 2003).

Os anestésicos dissociativos são antagonistas não competitivos do N-metil-D-aspartato (NMDA) e impedem a ligação deste aos aminoácidos excitatórios (Posner & Burns, 2009). Os NMDA são receptores de membrana de canal permeável principalmente ao cálcio e em menor extensão ao sódio e potássio. Os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato são neurotransmissores excitatórios primários do SNC que se ligam aos receptores NMDA, o que provoca a abertura dos respectivos canais, facilitando a entrada de cálcio e sódio e a saída de potássio, iniciando o potencial de acção. Estes fármacos ao impedirem a ligação do neurotransmissor excitatório ao receptor NMDA, impedem o fluxo de iões e inibem o estímulo excitatório mediado pelos neurotransmissores (Valadão, 2002). Os agentes dissociativos também alteram o funcionamento dos receptores opióides, monoaminérgicos, muscarínicos e dos canais de cálcio (Posner & Burns, 2009).

Os anestésicos deste grupo produzem uma dissociação dos sistemas tálamo-cortical e límbico, o que conduz a alterações da consciência ou catalepsia (Posner & Burns, 2009). O estado de inconsciência provocado pela cetamina é dependente da dose e da analgesia (Lin, 2003). A anestesia provocada pela administração destes anestésicos é então caracterizada por amnésia profunda, analgesia e catalepsia (Muir et al., 2000).

Mesmo em doses sub-anestésicas, os antagonistas dos receptores NMDA conservam as suas propriedades analgésicas (Posner & Burns, 2009; Valadão, 2002). A analgesia é selectiva, apresentando melhores resultados em dores superficiais do que em dores viscerais (Muir et al., 2000).

Estes anestésicos são geralmente utilizados para a contenção química de animais, para uma rápida indução da anestesia e para a analgesia (Posner & Burns, 2009). A cetamina é ainda recomendada para animais em estado crítico, em risco de depressão cardíaca e hipotensão (Lin, 2003).

Os anestésicos dissociativos quando utilizados sozinhos raramente produzem profundidade anestésica cirúrgica, enquanto que em associação com outros depressores do SNC originam relaxamento adequado e imobilidade (Posner & Burns, 2009).

Para inibir ou reduzir os efeitos adversos dos agentes dissociativos podem ser utilizados fármacos pertencentes aos seguintes grupos:

- antagonistas de receptores muscarínicos (como a atropina e a escopolamina);
- agonistas de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (como benzodiazepínicos e barbitúricos);
- antagonistas do receptor sigma (como a pentazocina);
- agonistas de receptores α -adrenérgicos (como a xilazina, a romifidina e a clonidina) (Valadão, 2002).

A cetamina origina um aumento significativo da pressão do fluxo sanguíneo cerebral, da pressão intracraniana e do líquido cefalorraquidiano, como resultado de uma elevada pressão arterial sistémica e vasodilatação cerebral (Lin, 2003).

Os efeitos cardiovasculares observados incluem efeitos simpatomiméticos mediados pelo SNC, inibição da captação neuronal de catecolaminas nas terminações nervosas simpáticas, vasodilatação directa do músculo liso vascular e efeito ionotrópico sobre o miocárdio (Lin, 2003). Sobre este último, a cetamina apresenta um efeito depressor directo, mas também um efeito indirecto estimulante, devido ao aumento da actividade simpática (Pawson & Forsyth, 2002). Os efeitos cardiovasculares incluem aumento da frequência cardíaca, aumento do

débito cardíaco e da pressão arterial e diminuição da contractilidade cardíaca, que aliada ao aumento da frequência cardíaca pode conduzir ao aparecimento de edema pulmonar ou insuficiência cardíaca aguda em animais com doença cardíaca pré-existente (Pawson & Forsyth, 2002; Muir et al., 2000). Estes efeitos estimulantes da cetamina no sistema cardiovascular podem ser reduzidos ou prevenidos pela pré-administração de benzodiazepínicos, fenotiazínicos e α -2 agonistas ou pela co-administração de anestésicos inalatórios (Valadão, 2002).

A cetamina pode provocar um padrão respiratório apnêustico, que é caracterizado por uma pausa prolongada após inspiração e é mais frequente após rápida administração do fármaco por via IV (Muir et al., 2000; Posner & Burns, 2009; Valadão, 2002). Com doses elevadas de anestésico a respiração torna-se superficial e irregular (Valadão, 2000). Geralmente este fármaco não exerce efeito sobre os gases sanguíneos, no entanto, em alguns pacientes, pode produzir hipóxia e hipercápnia, especialmente quando utilizada em associação com fármacos depressores do SNC. Os reflexos respiratórios protectores, como a tosse, o espirro e a deglutição persistem, assim como os reflexos laríngeos e faríngeos (Valadão, 2002). Provocam aumento da salivação e de secreções brônquicas, que podem ser reduzidas mediante a administração de um anticolinérgico (Lin, 2003). Este fármaco apresenta ainda propriedades broncodilatadoras (Posner & Burns, 2009; Valadão, 2002).

Com o uso de cetamina, é comum o aparecimento de hipertonicidade e rigidez muscular, mioclonia e/ou movimentos musculares descoordenados (Valadão, 2002; Posner & Burns, 2009). O efeito de tonicidade muscular é dose-dependente (Valadão, 2002). O relaxamento muscular é proporcionado pela administração simultânea de sedativos ou tranquilizantes, como por exemplo α -2 agonistas ou benzodiazepinas (Posner & Burns, 2009).

Os reflexos palpebral, conjuntival, corneal e de deglutição permanecem mesmo após administração de cetamina (Muir et al., 2000). A movimentação ocular e o nistagmo também são comuns após este tipo de anestesia (Valadão, 2002).

Os agentes dissociativos são altamente lipossolúveis, o que facilita a sua rápida absorção após administração por via IV, IM, intranasal, oral ou rectal. No entanto, as via IV e IM são as mais utilizadas (Valadão, 2002). A administração pela via IV assegura menores períodos de latência, dose e duração do efeito (10 a 15 minutos). No entanto, quando injectada em doses elevadas e rapidamente, pode provocar paragem cardíaca ou apneia (Lin, 2003; Valadão, 2002). Devido ao baixo pH das soluções, geralmente, a administração por via IM origina dor (Valadão, 2002).

A indução da anestesia com a cetamina é rápida, demorando cerca de 0,5 a 5 minutos até produzir efeito e apresenta aproximadamente entre 30 a 40 minutos de duração, variando de acordo com a via de administração e o tipo de pré-medicação utilizada, respectivamente (Valadão, 2002).

Visto que, a cetamina é metabolizada ao nível do fígado e eliminada pelos rins, esta deve ser utilizada com alguma precaução em animais com doenças hepáticas ou renais (Muir et al., 2000). Nos gatos, o metabolismo hepático é diminuto pelo que, a maior parte da cetamina é eliminada pelo rim sem ter sofrido transformação. A rápida recuperação anestésica observada é devido à rápida redistribuição da cetamina desde o SNC até aos tecidos, principalmente à gordura corporal, pulmão, fígado e rins (Lin, 2003).

Estudos acerca da farmacocinética da cetamina indicam uma rápida eliminação deste composto do plasma/soro com uma semi-vida de aproximadamente 40 a 60 minutos (Zambelli et al., 2007).

A pré-administração ou a associação de anestésicos dissociativos com sedativos ou tranquilizantes (agonistas α -2 como a xilazina, acepromazina ou uma benzodiazepina como o diazepam) pode atenuar ou evitar a ocorrência de eventuais alucinações verificadas durante o despertar do gato após anestesia com cetamina (Lin, 2003; Posner & Burns, 2009).

Quando os anestésicos dissociativos são associados a outros agentes, as principais acções obtidas dependem do grupo farmacológico a que os fármacos associados pertencem:

- α -2 agonistas induzem bradicardia, miorelaxamento e analgesia;
- benzodiazepínicos são responsáveis por hipnose, miorelaxamento e estabilidade circulatória;
- fenotiazínicos induzem hipotensão e tranquilização;
- opióides produzem hipotensão, sedação e analgesia;
- miorelaxantes que como o próprio nome indica induzem miorelaxamento (Valadão, 2002).

A administração destes anestésicos em associação com outros depressores do SNC pode aumentar a depressão respiratória e cardiovascular (Posner & Burns, 2009).

A cetamina está contra-indicada em animais com aumento da pressão intracraniana e com taquicardia. Deve ser utilizada com precaução em doentes com doença arterial coronária, hipertensão arterial não controlada, cardiomiopatia ou insuficiência cardíaca. Não deve ser utilizada em animais com pressão intra-ocular elevada, glaucoma, úlcera da córnea profunda ou descemetocle. Agentes dissociativos devem ser evitados em pacientes com tónus simpático elevado, como por exemplo animais com hipertiroidismo ou feocromocitoma, uma

vez que a administração destes fármacos pode aumentar os níveis de norepinefrina e exacerbar os efeitos colaterais dessas doenças. Recomenda-se ainda precaução em doentes em que a excreção dos metabolitos activos possa estar diminuída, como gatos com obstrução uretral ou insuficiência renal anúrica. Em animais com hipertermia maligna, epilepsia ou submetidos a mielografia a administração deste fármaco também deve ser evitada (Pawson & Forsyth, 2002; Posner & Burns, 2009).

6. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO SÉMEN

Após realização da colheita, o sémen é avaliado tendo em vista diferentes objectivos como a sua utilização na reprodução assistida, na realização de diagnósticos e na obtenção de informação para a investigação (Stornelli, 2007).

No que diz respeito à capacidade reprodutiva do macho, esta avaliação constitui um método complementar essencial, devendo ser analisada de acordo com os parâmetros considerados normais para o macho em questão (Stornelli, 2007).

No gato, assim como no cão, não existem protocolos estabelecidos para a colheita de sémen em relação à actividade sexual. Em humanos, para uma correcta avaliação do sémen é recomendada a realização de duas colheitas, a primeira após um período de repouso sexual de 2 a 7 dias e a segunda 7 a 21 após a primeira (Root Kustritz, 2007).

Uma avaliação de rotina de sémen de gato inclui a determinação de parâmetros macroscópicos como o volume e a cor e de parâmetros microscópicos como a mobilidade, a morfologia, a concentração e o número total de spz no ejaculado. Por vezes, pode ser necessária a avaliação da integridade da membrana, utilizando técnicas específicas como a microscopia electrónica de transmissão, a avaliação do pH, da osmolalidade e do fluido seminal (cultura microbiana e análise química) (Zambelli & Cunto, 2006).

6.1. Volume

O volume do ejaculado do gato é pequeno e varia de acordo com o método utilizado para a sua obtenção. O pequeno volume seminal recolhido limita muitas vezes o número de análises a serem efectuadas, obrigando a que exista uma selecção das mesmas de acordo com as necessidades do caso (Axné & Linde-Forsberg, 2002; Stornelli, 2007). Se o volume for muito pequeno, pode ser necessário diluir as amostras antes do processo de avaliação do sémen. Esta diluição pode ser responsável pelo aumento do número de caudas dobradas e

enroladas dos spz, devido às diferenças osmóticas entre o líquido seminal e o diluidor (Axnér & Linde-Forsber, 2002). A informação do volume é importante para o cálculo do número total de spz por ejaculado (Johnston et al., 2001). Há grande variação do volume seminal em função da idade, da raça, da actividade reprodutiva do gato, do número de ejaculações sucessivas de um mesmo animal e da técnica utilizada para a colheita (Stornelli, 2007; Zambelli & Cunto, 2006; Zambelli & Levy, 2010).

Segundo Axnér e Linde-Forsberg (2002), o volume de sémen recolhido por VA varia entre 10 e 120 μ L (média: 34 a 40 μ L) e por EE entre 19 e 740 μ L (média: 76 a 220 μ L). Para a recolha por VA, Zambelli e Levy (2010) referem os mesmos volumes anteriormente descritos sendo que, por EE o volume de sémen recolhido varia entre 140 e 738 μ L (média de 233 μ L) (Zambelli & Levy, 2010). Por CT o volume médio de sémen recolhido é de 10,5 \pm 5,3 μ L (Zambelli et al., 2008).

6.2. Cor

A coloração normal de uma amostra de sémen de gato é branca e a intensidade da cor reflecte a concentração de spz. Por vezes, a amostra pode apresentar cor amarela o que indica contaminação da mesma por urina, amarela a verde o que indica a presença de células inflamatórias ou de pus ou vermelha a castanha quando contaminada com sangue (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli & Levy, 2010). Durante a colheita de sémen, pode ocorrer dano na uretra provocado pelo catéter, podendo ser observável uma pequena hematospermia, que não apresenta qualquer influência na fertilidade nem nos parâmetros de avaliação do sémen (Malandain, 2005). Amostras muito transparentes geralmente indicam azoospermia (ausência de spz no ejaculado) (Johnston et al., 2001). No gato, as causas de azoospermia incluem a administração de glucocorticóides durante longos períodos de tempo ou em doses elevadas, a administração de outros esteróides, a febre ou doença sistémica. Outras causas possíveis para justificar a ausência de spz no ejaculado incluem a intersexualidade, a criptorquidia, trauma testicular, orquite, degenerescência testicular, hipoplasia e neoplasia testiculares e ainda situações como os quistos epididimários, a epididimite, o espermatocelo e os granulomas espermáticos (Zambelli & Levy, 2010).

6.3. Mobilidade

A mobilidade do sémen é avaliada colocando uma gota de sémen numa lâmina e observada com uma ampliação de 100 a 400 vezes, imediatamente após a colheita (Zambelli & Cunto, 2006). A mobilidade dos spz é extremamente sensível à temperatura pelo que deve ser avaliada numa lâmina pré-aquecida ou utilizando um microscópio óptico normal ou de contraste de fase com platina térmica, que mantenha a amostra a uma temperatura de 37/38°C (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli & Levy, 2010). A mobilidade é um parâmetro de avaliação subjectivo, devendo ser caracterizado o tipo de movimentos que os spz apresentam e determinada a percentagem de spz com movimentos progressivos e rectilíneos (Zambelli & Levy, 2010). Segundo Salviano e Souza (2008), os movimentos dos spz não obedecem a um padrão único, existem vários tipos de deslocamento das células, movimento progressivo e rectilíneo (para a frente), movimento circular (em circunferência), movimento oscilatório ou local (quando os spz se limitam a oscilar no campo do microscópio) e movimento retrógrado. A percentagem de spz com mobilidade progressiva considerada normal para esta espécie situa-se entre 60 e 90% (Johnston et al., 2001). A velocidade dos movimentos progressivos dos spz é avaliada segundo uma escala de 0 a 5. O sémen fresco de gato deve estar incluído na categoria 4 (rápido) ou 5 (muito rápido) para que seja considerado normal (Stornelli, 2007). Vários factores como o frio, o tipo de diluidor, o contacto dos spz com lubrificantes, látex ou detergentes ou as doenças infecciosas do tracto reprodutivo podem ser responsáveis por causar uma diminuição da mobilidade. A mobilidade progressiva pode aumentar com a adição de um diluidor ou com colheitas repetidas (Zambelli & Levy, 2010). A mobilidade é altamente variável, podendo variar entre colheitas no mesmo gato e está relacionada com a duração da abstinência sexual (Axnér et al., 1997).

Devido à subjectividade das técnicas utilizadas para a análise microscópica do sémen felino, os parâmetros de qualidade dos spz, principalmente a mobilidade, variam consideravelmente entre laboratórios. Esta variabilidade dificulta o processo de comparação e interpretação de resultados (Filliers et al., 2008). Para reduzir esta subjectividade, foi desenvolvido o sistema CASA (“Computer-assisted sperm analysis”), com um microscópio de contraste de fase incorporado, que permite avaliar de forma objectiva parâmetros de qualidade dos spz como a mobilidade, velocidade, morfologia e concentração, conseguindo detectar pequenas alterações nestes parâmetros, impossíveis de detectar pelos métodos convencionais (Filliers et al., 2008; Matos, Araújo, Roberto & Toniolli, 2008; Verstegen, Iguer-Ouada & Onclin, 2002). Filliers et al. (2008) realizaram um estudo em que um dos objectivos era estabelecer valores de

referência CASA para parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos após centrifugação da amostra por gradiente de densidade. Para além da execução do exame, estes sistemas permitem o armazenamento de informações relevantes e a criação de um banco de dados, conferindo elevados níveis de precisão, confiança e velocidade na obtenção de dados (Matos et al., 2008). As desvantagens deste método estão relacionadas com a necessidade de validação do sistema antes de qualquer utilização prática, controle de qualidade e padronização das avaliações realizadas, para além do elevado custo do equipamento (Matos et al., 2008; Verstegen et al., 2002).

Os parâmetros da mobilidade espermática avaliados pelo CASA de acordo com Verstegen et al. (2002) são:

- a velocidade curvilínea (VCL – “curvilinear velocity”) – que é a média das velocidades medidas em vários pontos do percurso do espermatozóide, expressa em micrómetro/segundo ($\mu\text{m}/\text{seg}$);
- a velocidade linear progressiva (VSL – “straight line velocity”) – que é a velocidade média medida em linha recta, entre o primeiro e o último ponto do trajecto do espermatozóide, expressa em $\mu\text{m}/\text{seg}$;
- a velocidade média da trajectória (VAP – “average path velocity”) – que é a velocidade média do percurso percorrido pelo espermatozóide, expressa em $\mu\text{m}/\text{seg}$;
- a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH – “amplitude of lateral head displacement”) – que é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide no seu percurso real, expressa em μm . Este parâmetro está relacionado com a capacidade de penetração do espermatozóide na zona pelúcida do óvulo (Matos et al., 2008);
- a frequência de batimento flagelar (BCF – “beat cross frequency”) – que é o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direcção do movimento, expressa em hertz;
- a rectilinearidade (STR – “straightness”) – que é o valor médio do rácio VSL/VAP, expresso em percentagem;
- a linearidade (LIN – “linearity”) – que é o valor médio do rácio VSL/VCL, expresso em percentagem.

A análise pelo CASA dos diferentes parâmetros de avaliação dos spz pode ser afectada por vários factores: a experiência do observador, a identificação da espécie e da amostra, a profundidade da câmara utilizada, a temperatura, a diluição e tipo de diluidor utilizado, o tempo entre a colheita da amostra e a sua análise, o método de processamento da amostra, o instrumento utilizado, a concentração espermática e a frequência de aquisição de imagens

(Matos et al., 2008). Este método de avaliação CASA é aplicado aos spz das diferentes espécies.

6.4. Morfologia

No gato, o espermatozóide mede aproximadamente 26µm de comprimento, sendo mais pequeno que o de cão que mede aproximadamente 36µm de comprimento (Johnston et al., 2001). O seu pequeno tamanho dificulta bastante a sua observação e avaliação morfológica mediante microscopia óptica (Stornelli, 2007). Para avaliar a morfologia, entre 100 a 200 spz, seleccionados de forma aleatória, devem ser observados num microscópio óptico normal ou de contraste de fase, com uma ampliação de 400 a 1000 vezes (Johnston, 2001; Zambelli & Levy, 2010). A ultramicroscopia mediante o uso de microscópio electrónico é utilizada apenas em trabalhos de investigação, para avaliar alterações morfológicas do espermatozóide ou outras alterações específicas, as quais não poderiam ser diagnosticadas sem o uso desta tecnologia (Stornelli, 2007).

As alterações dos spz podem ser classificadas como primárias, alterações que ocorrem durante a espermatogénese ou secundárias, alterações que ocorrem no epidídimo durante o armazenamento e maturação ou que ocorrem durante a preparação da amostra. Podem também ser classificadas de acordo com a parte do espermatozóide afectada (cabeça, acrossoma, peça intermédia e cauda) ou como alterações maiores (aqueles de maior impacto sobre a fertilidade) ou menores (Johnston et al., 2001).

A percentagem média de spz normais no gato é geralmente cerca de 70% (Johnston et al., 2001), sendo que, as alterações primárias e secundárias devem ser inferiores a 10% e 20%, respectivamente. Durante a contagem, deve ser tido em consideração que se um espermatozóide apresentar mais do que uma alteração, a assinalada deve ser sempre a mais grave e que para efeitos de contagem só devem ser consideradas as cabeças destacadas e nunca as caudas (Feldman & Nelson, 2004; Freshman, 2002). A observação morfológica dos spz deve ser efectuada no terço médio da lâmina, onde estes sofrem menos alterações provocadas pela técnica de preparação (Root Kustritz, 2007).

Muitos factores influenciam a morfologia dos spz do ejaculado. A prolongada abstinência sexual, o trauma testicular, as infecções do aparelho reprodutor e a pirexia são causas de alterações nos spz (Johnston et al., 2001). Axné e Linde-Forsberg (2007) efectuaram um estudo retrospectivo em que um dos objectivos foi avaliar os efeitos da idade, época do ano e raça na morfologia dos spz de gatos. Neste estudo, a idade não apresentou qualquer efeito sobre a percentagem de spz morfológicamente normais mas foi correlacionada positivamente

com a percentagem de gotas citoplasmáticas distais, a percentagem de spz normais foi maior entre Fevereiro e Julho do que entre Agosto e Janeiro e gatos de raça apresentaram menor percentagem média de spz normais do que gatos comuns.

No gato, foi estabelecido como normospermico, o sémen com mais de 60% de spz normais (Stornelli, 2007). No entanto, os gatos são frequentemente afectados por teratozoospermia (> 60% de spz anormais), que pode estar associada a uma diminuição da variação genética e a uma diminuição da secreção de testosterona (Zambelli & Levy, 2010).

No gato, as alterações morfológicas encontradas com mais frequência são a macro e microcefalia, cabeças duplas ou destacadas, peças intermédias dobradas, gotas citoplasmáticas proximal ou distal e caudas duplas, dobradas ou enroladas (Johnston et al., 2001).

As avaliações da morfologia podem ser realizadas através da observação de preparações fixadas com gluteraldeído ou coradas. Embora as primeiras possibilitem a avaliação da morfologia sem artefactos induzidos pelo processo de coloração e uma melhor visualização de gotas citoplasmáticas, o esfregaço corado facilita a visualização do acrossoma (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Villaverde, Melo, Corrente, Papa & Lopes, 2008; Zambelli & Levy, 2010). Para preservar amostras de sémen para posterior avaliação, pode ser utilizada a solução de Hancock e Gledhill (Zambelli & Cunto, 2006; Zambelli & Levy, 2010). Os tipos de coloração mais utilizados na avaliação da morfologia são o Diff-Quick, a eosina nigrosina, o Giemsa e o Spermac (Johnston et al., 2001; Stornelli, 2007). A coloração Fast-Green FCF/Rosa Bengala, também utilizada para avaliação da morfologia de spz, é um método que permite uma excelente diferenciação das estruturas constituintes dos spz, principalmente da integridade da membrana do acrossoma, induzindo menos artefactos do que qualquer outro método de coloração (Zambelli & Cunto, 2006; Zambelli & Levy, 2010). Para a coloração dos spz com a coloração Fast-Green FCF/Rosa Bengala, o sémen é diluído em citrato de sódio 2,9% e incubado durante 70 segundos à temperatura ambiente com igual volume de solução corante. Uma gota da mistura é espalhada sobre uma lâmina de microscópio e seca ao ar a 37°C. A integridade do acrossoma é avaliada com uma ampliação de 1000 vezes e, caso esteja intacto, a parte anterior da cabeça do spz apresenta coloração azul-púrpura. Se tiver ocorrido perda da integridade da membrana do acrossoma, a porção anterior da cabeça apresenta-se incolor a rosa claro (Johnston et al., 2001).

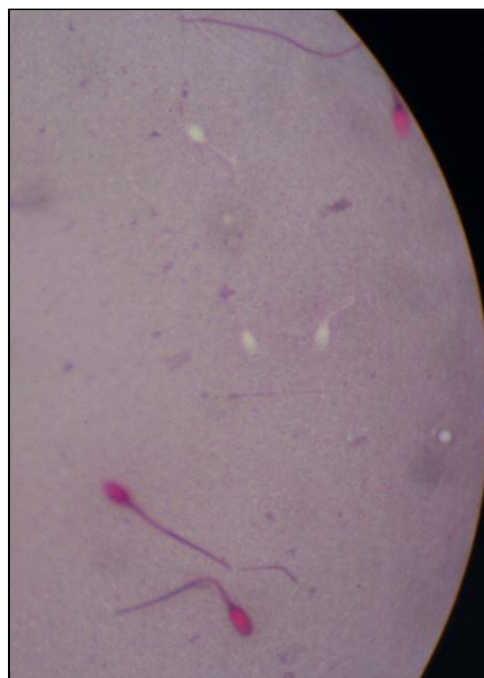
A coloração eosina-nigrosina é uma coloração vital que, para além de permitir observar a morfologia dos spz, permite diferenciar spz vivos e mortos (Figura 2). Os spz vivos apresentam coloração branca e os mortos coloração rosa devido à penetração do corante (eosina) nas membranas danificadas dos spz mortos (Zambelli & Levy, 2010). A visualização dos spz vivos é facilitada pela utilização de um corante de contraste, a nigrosina (Silva, 2006). Para corar os spz, mistura-se, com cuidado, uma gota de sémen com uma gota de corante e de seguida, faz-se o esfregaço e deixa-se secar ao ar (Johnston et al., 2001).

Para a coloração dos spz pelo Diff-Quik é primeiro efectuado um esfregaço de sémen numa lâmina para microscópio e seco ao ar. De seguida, a lâmina é introduzida durante 5 minutos em cada uma de três soluções (solução de fixação, coloração eosina, coloração hematoxilina), lavada com água destilada e novamente seca ao ar (Johnston et al., 2001). Apresenta como vantagens a sua rápida execução, eficácia e o facto de estar geralmente disponível na maioria das clínicas/laboratórios. Embora não core o acrossoma dos spz, é útil para identificar a contaminação do ejaculado com sangue ou células prostáticas (Feldman & Nelson, 2004; Zambelli & Levy, 2010).

O uso do corante Spermac permite obter uma coloração rápida e proporciona características exclusivas. O núcleo dos spz cora de vermelho, o acrossoma, a peça intermédia e a cauda de verde e a zona equatorial do acrossoma de verde pálido (Feldman & Nelson, 2004).

É necessário considerar, que os diluidores de sémen utilizados para a criopreservação interferem com as colorações utilizadas. Uma forma de reduzir os artefactos provocados por alguns componentes presentes nos diluidores, como a gema de ovo e o leite, é a lavagem (Stornelli, 2007). No entanto, se o corante utilizado for o Spermac, estas interferências não se verificam (Feldman & Nelson, 2004).

Figura 2 – Amostra de sémen de gato doméstico corada com eosina-nigrosina em que se diferencia spz vivos (brancos) de mortos (rosa)



(Ampliação: 1000x)

É de referir, que para uma correcta comparação de morfologia entre animais e no mesmo animal, é essencial utilizar sempre a mesma técnica de preparação e coloração da amostra (Feldman & Nelson, 2004).

6.5. Concentração

No gato, a concentração varia muito de acordo com a técnica de colheita de sémen utilizada (Zambelli & Levy, 2010). Para avaliação da concentração, uma parte da amostra de sémen é diluída 1:40 até 1:100 em formol-citrato a 1%, dependendo da concentração inicial da amostra (Axné & Linde-Forsberg, 2002). Em alternativa, pode-se utilizar a água destilada como diluidor a 1:10, 1:25, 1:50 ou 1:100 (Johnston et al., 2001). A contagem é realizada numa câmara de contagem (como por exemplo a câmara de Neubauer, Burkner ou Makler), com o auxílio de um microscópio (Axné & Linde-Forsberg, 2002; Stornelli 2007).

O número total de spz por ejaculado pode ser calculado multiplicando a concentração (em milhões/mililitro) pelo volume (em mililitros) de sémen total recolhido (Johnston et al., 2001).

A concentração e o número total de spz variam de acordo com a idade, técnica de colheita, época do ano e frequência da ejaculação (Reyna, 2006a; Stornelli, 2007; Zambelli & Cunto, 2006; Zambelli & Levy, 2010). Leite (2009) refere ainda que o número total de spz recolhido depende de factores genéticos, peso corporal e tamanho dos testículos dos animais.

Na tabela 3 estão resumidos os resultados referentes à concentração obtidos por vários autores.

Tabela 3 – Exemplos de concentração e número total de spz em gatos domésticos obtidos por VA, EE, CT e EP

	VA	EE	CT	EP	Referência bibliográfica
Número total de spz ($\times 10^6$)	V: 3 a 117 M: 57 a 61	V: 9 a 153 M: 12 a 30	21,0 \pm 18,1		(Axnér & Linde-Forsberg, 2002)
		33,6 \pm 34,5			(Zambelli et al., 2008)
Concentração de spz ($\times 10^6$ spz/mL)	V: 96 a 5101 M: 1730	M: 168 a 361	1868,4 \pm 999,8	44,1 \pm 54,9	(Axnér & Linde-Forsberg, 2002)
		542,9 \pm 577,9			(Zambelli et al., 2008)
		111,2 \pm 75,3			(Tebet, Martins, Chirinea, Souza, Campagnol & Lopes, 2006)

V= varia; M= média.

6.6. Integridade da membrana

Avalia-se rotineiramente através da utilização de corantes como a eosina nigrosina ou a eosina azul de anilina, que permitem diferenciar entre spz vivos e mortos. As colorações fluorescentes (rodamina-isotiocianato de fluoresceína) permitem avaliar a integridade da membrana detectando alterações mínimas da mesma. Tal como nos cães, o teste hiposmótico também pode ser utilizado para avaliar a integridade da membrana dos spz (Stornelli, 2007).

O teste hiposmótico para além de permitir avaliar a morfologia e a integridade da célula espermática, permite avaliar a capacidade funcional da membrana em realizar trocas com o meio extracelular. Para a realização deste teste, uma amostra de sémen é incubada a 37°C durante 45 a 60 minutos em um meio hiposmótico e, posteriormente avaliada através do uso de um microscópio. Os meios hiposmóticos descritos incluem o citrato de sódio (7,35g) com frutose (13,51g) em 1000mL de água destilada ou uma solução de 100mM de sacarose. Os spz com membranas plasmáticas íntegras e funcionalmente activas apresentam-se, à microscopia, túrgidos e com caudas enroladas (Cunha, 2008; Root Kustritz, 2007).

Devido ao pequeno volume de sémen recolhido em gatos, poucos estudos existem relativos às características químicas do plasma seminal. No entanto, Johnston et al. (2001) descrevem as características químicas do plasma seminal, do fluido prostático e das secreções das glândulas bulbouretrais.

6.7. pH

Segundo Stornelli (2007), o pH do sémen felino varia entre 6,6 e 8,8. Esta alcalinidade natural aumenta a mobilidade espermática e neutraliza a acidez da cavidade vaginal durante a cópula. O aumento do pH pode estar associado à ejaculação incompleta ou à inflamação do aparelho reprodutor masculino (Feldman & Nelson, 2004). A avaliação do pH é útil para a selecção de um antibiótico em caso de infecção do tracto reprodutor do gato (Freshman, 2002).

A contaminação do sémen com urina em carnívoros altera o pH para valores mais ácidos e pode ser ainda responsável pela redução da mobilidade e por uma elevada proporção de spz com caudas dobradas (Filliers et al., 2010; Griggers, Paccamonti, Thompson & Eilts, 2001; Zambelli et al., 2008).

6.8. Osmolalidade

A osmolalidade do sémen do gato é de aproximadamente 320mOsm/kg (Johnston et al., 2001; Stornelli, 2007).

6.9. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é produzida ao nível do epidídimo e pode servir como marcador epididimário (Johnston et al., 2001). Concentrações baixas de ALP no ejaculado indicam ejaculação incompleta ou obstrução bilateral do epidídimo ou do canal deferente. Concentrações elevadas são encontradas em ejaculados completos (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Johnston et al., 2001). Johnston et al. (2001) descrevem valores para ALP de $160 \pm 15,558$ U/L para o plasma seminal, 445 ± 170 U/L para o fluido prostático e bulbouretral e 281 ± 164 U/L para o fluido prostático.

6.10. Microbiologia seminal

As bactérias aeróbicas isoladas a partir de ejaculados provenientes de gatos incluem: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* Estas bactérias provavelmente constituem a flora comensal da uretra distal e do prepúcio (Johnston et al., 2001).

7. RELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DO SÉMEN E A FERTILIDADE

As características seminais que possuem maior correlação com a fertilidade são o número total de spz, a percentagem de spz com mobilidade progressiva e a percentagem de alterações morfológicas observadas no ejaculado (Stornelli, 2007).

É importante ter em mente que a avaliação de um só ejaculado não permite tirar conclusões definitivas sobre a fertilidade do gato (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Stornelli, 2007).

Segundo Johnston et al. (2001), a velocidade dos movimentos progressivos e a percentagem de spz com mobilidade progressiva são factores essenciais à fertilidade. No entanto, não existem estudos que correlacionem estes factores com a capacidade fecundante dos spz.

Embora, nos gatos, não se conheça a relação exacta entre os defeitos morfológicos específicos e a fertilidade (Stornelli, 2007), num estudo retrospectivo realizado por Axnér e Linde-Forsberg (2007), a baixa qualidade do sémen de alguns gatos não demonstrou ter influência na fertilidade. Gatos com menos de 40% de spz normais e com registos prévios de cruzamentos férteis.

Howard, Bush e Wildt (1991), relacionaram a morfologia espermática com a capacidade de penetração dos spz nos oócitos *in vitro* em gatos domésticos. Concluíram que, ejaculados com mais de 60% de alterações morfológicas resultam em menores taxas de penetração na zona pelúcida quando comparados com ejaculados que apresentam menor quantidade de formas anormais (< 40%).

Provavelmente será mais importante considerar a proporção das diferentes alterações do que a percentagem de spz normais, pois diferentes alterações apresentam diferentes efeitos sobre a fertilidade (Zambelli & Levy, 2010). Possivelmente, as alterações primárias dos spz têm uma maior influência sobre a fertilidade do que os outros tipos de alterações. Por vezes, observa-se a presença de spz no ejaculado com gotas citoplasmáticas proximais ou distais, sendo que, às últimas, se atribui normalmente menos importância. Spz com gotas citoplasmáticas proximais apresentam geralmente uma diminuição da capacidade de fertilização (Axnér & Linde-Forsberg, 2002).

Não existe nenhum estudo que demonstre quais os valores mínimos para os parâmetros de avaliação do sémen no gato, associados com uma fertilidade normal. No entanto, é aceitável assumir que quanto maior é o número de spz morfolologicamente normais e com boa mobilidade, melhor é a fertilidade (Axnér & Linde-Forsberg, 2002).

Em gatos com maus resultados reprodutivos, as principais alterações encontradas foram a azoospermia (ausência total de spz), a oligozoospermia (baixo número total de spz), a

teratozoospermia (> 60% spz anormais) e a astenozoospermia (< 70% spz com mobilidade progressiva) (Axnér & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli & Levy, 2010). Apenas a associação de azoospermia total, não associada à ejaculação retrógrada e uma concentração de fosfatase alcalina elevada no sémen pode conduzir a um diagnóstico de infertilidade (Malandain, 2005).

III – ESTUDO

1. OBJECTIVO

Este estudo teve como objectivo comparar os parâmetros de qualidade de sémen de gatos domésticos, recolhido por cateterização uretral (CT) e a partir do epidídimo (EP), utilizando dois protocolos anestésicos diferentes. Desta forma, pretendeu-se verificar qual a influência da técnica de recolha e do protocolo anestésico nos seguintes parâmetros de qualidade do sémen fresco: mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no HVBV com a colaboração da Policlínica Veterinária de Aveiro, da Clínica Veterinária de Anadia e da Clínica Veterinária de Oia.

2.1. Animais

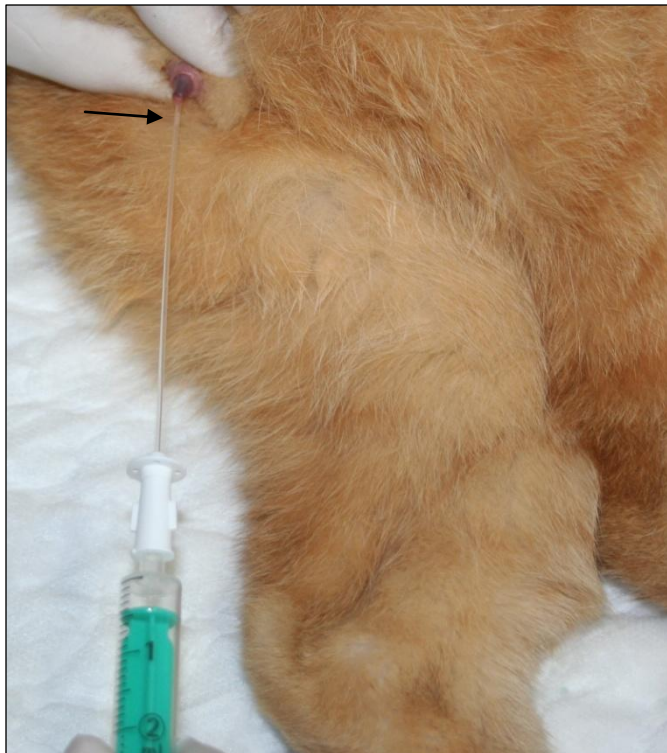
Foram utilizados 10 gatos machos, sem raça definida, com idades compreendidas entre os 11 meses e os 5 anos de idade e pesos entre os 3,700 e os 5,680kg, todos com livre acesso à rua, que foram trazidos à consulta para orquiectomia. Os critérios de inclusão para os gatos utilizados no estudo foram a idade (mínimo 10 meses e máximo 5 anos), o peso (superior a 3 e inferior a 6kg), o livre acesso ao exterior e a ausência de alterações clínicas. A cada animal foi realizado o exame físico do estado geral e o exame andrológico, que consistiu na exteriorização e observação do pénis e palpação dos testículos. A duração da abstinência sexual dos animais utilizados neste estudo é totalmente desconhecida assim como a frequência de ejaculação. Os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de pelo menos 12 horas. O estudo foi realizado no período compreendido entre 12 Janeiro de 2011 e 25 de Fevereiro de 2011.

2.2. Colheita e avaliação de sémen

É importante referir que durante todo o procedimento, os animais foram rigorosamente avaliados e controlados relativamente a parâmetros como a temperatura corporal, frequência respiratória e cardíaca. Após a realização do exame clínico de rotina, cada gato foi anestesiado de acordo com o protocolo anestésico estabelecido:

- Protocolo anestésico 1 (P1): animais anestesiados exclusivamente com cloridrato de medetomidina (Medetor®) na dose de 100µg/kg p.v. IM para a CT (adaptado de: Zambelli & Cunto, 2006). Após a colheita de sémen por CT e imediatamente antes da orquiectomia, foi administrado a cada animal 10mg de cetamina-HCL (Clorketam®) IM;
- Protocolo anestésico 2 (P2): o protocolo anestésico utilizado para a colheita de sémen por CT e orquiectomia, consistiu na associação de cloridrato de medetomidina (Medetor®) na dose de 80µg/kg p.v. IM e de cetamina-HCL (Clorketam®) na dose de 5mg/kg p.v. IM (adaptado de: Axné & Linde-Forsberg, 2002; Zambelli & Cunto, 2006).

Dos 10 gatos utilizados para a recolha de sémen, 5 foram anestesiados com o P1 e os outros 5 com o P2 sendo que, a distribuição dos gatos pelo protocolo anestésico foi aleatória. Foram realizadas no total 20 colheitas de sémen, 10 por CT e 10 a partir do EP sendo que, a cada animal foram efectuadas duas colheitas de sémen, uma por CT e a outra a partir do EP, utilizando as técnicas abaixo descritas. Para a colheita de sémen por CT, um catéter urinário para gatos (Buster® Cat cateter, 1.0mm x 13.0cm) foi inserido aproximadamente 9cm na uretra, de modo a atingir a uretra prostática e com cuidado para não atingir a bexiga. Ao catéter acoplou-se uma seringa de 2mL e realizaram-se sucessivas retracções do êmbolo da mesma, à medida que se ia retirando o catéter da uretra de modo a recolher o sémen aí libertado (Figura 3). Imediatamente após a colheita bem sucedida, a amostra de sémen foi transferida para um eppendorf pré-aquecido com 300µL de Tris-citrato. De seguida, procedeu-se à avaliação do sémen.

Figura 3 – Recolha de sémen por CT (seta preta: sémen)

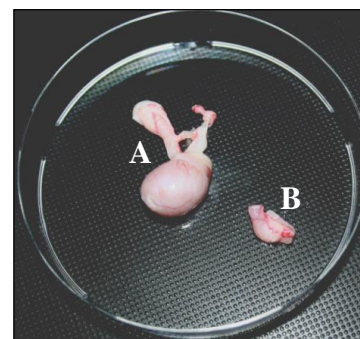
Após a orquiectomia, os testículos juntamente com o epidídimo foram recolhidos, lavados com NaCL a 0,9% aquecido a uma temperatura aproximada de 37°C e de seguida, colocados numa placa de Petri com a mesma solução. Cada epidídimo foi separado do respectivo testículo (Figura 4) e a cauda do epidídimo foi repetidamente seccionada e colocada num eppendorf pré-aquecido com 300μL de Tris-citrato, durante 10 minutos, para permitir a saída dos spz para o meio circundante. De seguida, os restos da cauda do epidídimo foram removidos do meio, procedendo-se posteriormente à avaliação do sémen.

Imediatamente após a recolha por CT procedeu-se à avaliação da cor do sémen recolhido. Os restantes procedimentos de avaliação incluíram a determinação da percentagem de mobilidade total dos spz, da percentagem de spz com movimentos progressivos e da percentagem de spz vivos com morfologia normal e com alterações.

Figura 4 –

A: Testículo com epidídimo;

B: Epidídimo contralateral separado do respectivo testículo



Imediatamente após a recolha, avaliou-se a mobilidade mediante deposição de uma gota de sémen diluído em Tris-citrato, numa lâmina previamente aquecida e observada utilizando um microscópio óptico, com uma ampliação total de 400x. Calculou-se a percentagem de spz com mobilidade progressiva, procedendo-se à contagem de 100 spz (25 spz em cada campo óptico).

Para avaliação da viabilidade e morfologia da amostra foi realizado um esfregaço, com o corante eosina-nigrosina, segundo a técnica descrita por Silva (2006) e observado, numa ampliação total de 1000x. Para o cálculo da viabilidade e da morfologia procedeu-se à contagem de 150 e 100 spz, respectivamente. A morfologia foi avaliada apenas em spz vivos. Quanto às alterações morfológicas dos spz estas foram classificadas de acordo com a parte do espermatozóide afectada (cabeça, peça intermédia e cauda) (Anexo I).

2.3. Análise estatística

Os dados foram analisados recorrendo ao programa *STATISTICA for Windows*, (Statistica 5.0, StatSoft Inc., 1995, Tulsa, EUA).

Na análise dos diferentes parâmetros de avaliação do sémen utilizou-se a análise de variância múltipla (MANOVA), com dois efeitos fixos: efeito técnica de colheita (n=2) e efeito protocolo anestésico (n=2). Os efeitos estatisticamente significativos foram posteriormente reavaliados *post-hoc* pelo teste das diferenças mínimas significativas (LSD). O nível de significância escolhido foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Exame físico e andrológico

Todos os animais utilizados neste estudo encontravam-se em bom estado de saúde, não tendo sido detectadas quaisquer alterações no exame físico do estado geral nem no exame andrológico.

3.2. Cor do sémen recolhido por CT

Todos os ejaculados recolhidos por CT apresentaram uma coloração branca, com diferentes intensidades.

3.3. Resultados individuais para os parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos domésticos

Os resultados individuais para os parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos domésticos, recolhido por CT e a partir do EP, de acordo com o protocolo anestésico utilizado estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados individuais para os parâmetros de avaliação do sémen fresco de gatos domésticos, recolhido por CT e a partir do EP, de acordo com o protocolo anestésico utilizado

ID	TC	P	MOB T (%)	MOB P (%)	V (% spz vivos)	MORF (% spz vivos e n)	MORFOLOGIA (% spz vivos com alt)		
							Alt cabeça (%)	Alt PI (%)	Alt cauda (%)
1	CT	1	52,0	40,0	38,0	21,55	2,55	0,0	13,9
2	CT	1	80,2	58,4	72,2	52,7	3,9	5,85	9,75
3	CT	1	45,7	19,7	53,0	26,5	8,9	8,8	8,8
4	CT	1	57,0	25,4	38,5	28,0	2,3	3,5	4,7
5	CT	1	18,0	13,0	26,3	14,23	1,42	2,13	8,52
6	CT	2	74,1	64,8	72,6	66,4	1,9	3,1	1,2
7	CT	2	40,6	26,0	42,6	28,968	2,556	4,26	6,816
8	CT	2	45,1	2,7	58,3	26,24	1,05	2,68	28,33
9	CT	2	70,0	59,8	71,3	48,6	0,6	1,1	21,0
10	CT	2	52,7	39,0	58,7	48,96	1,53	2,05	6,16
1	EP	1	54,0	47,0	74,0	22,6	20,6	0,0	30,8
2	EP	1	59,2	45,8	75,0	58,6	0,0	0,0	16,4
3	EP	1	67,6	53,3	67,3	53,1	0,0	10,6	3,6
4	EP	1	54,4	35,6	32,3	24,0	1,8	0,0	6,5
5	EP	1	83,8	67,6	53,0	44,1	1,5	1,5	5,9
6	EP	2	60,0	35,2	64,7	57,13	3,49	2,33	1,75
7	EP	2	51,9	39,4	80,4	47,6	12,7	6,4	13,7
8	EP	2	55,0	38,0	38,6	31,27	0,0	0,77	6,56
9	EP	2	69,0	60,2	54,3	38,7	1,6	1,1	12,9
10	EP	2	55,7	44,3	44,6	37,1	3,35	1,25	2,90

ID – Identificação do animal; TC – Técnica de colheita; CT – Cateterização uretral; EP – Epidídimo; P – Protocolo anestésico; MOB T – Mobilidade total; MOB P – Mobilidade progressiva; V – Viabilidade; MORF – Morfologia; n – normais; Alt – Alterações; PI – peça intermédia.

De modo a facilitar a leitura dos resultados, os resultados das amostras foram agrupados de acordo com a técnica de recolha e o protocolo anestésico utilizado, em quatro grupos.

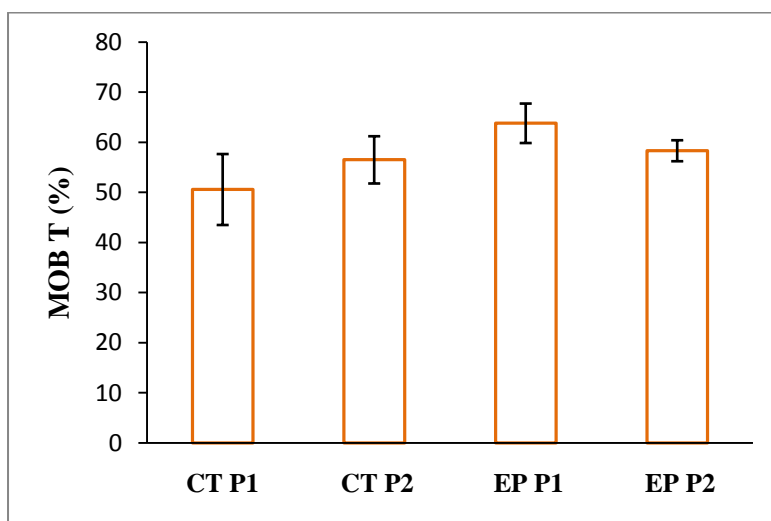
3.4. Mobilidade

A média dos spz com mobilidade (MOB T) nos quatro grupos está resumida na Tabela 5 e exemplificada no Gráfico 1.

Tabela 5 – Mobilidade total (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)

MOB T (%)	CT P1	CT P2	EP P1	EP P2
Média	50,6	56,5	63,8	58,3
Erro padrão	7,1	4,7	3,9	2,1
Máximo	80,2	74,1	83,8	69,0
Mínimo	18,0	40,6	54,0	51,9

Gráfico 1 – Mobilidade total (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)



Barras representam o erro padrão.

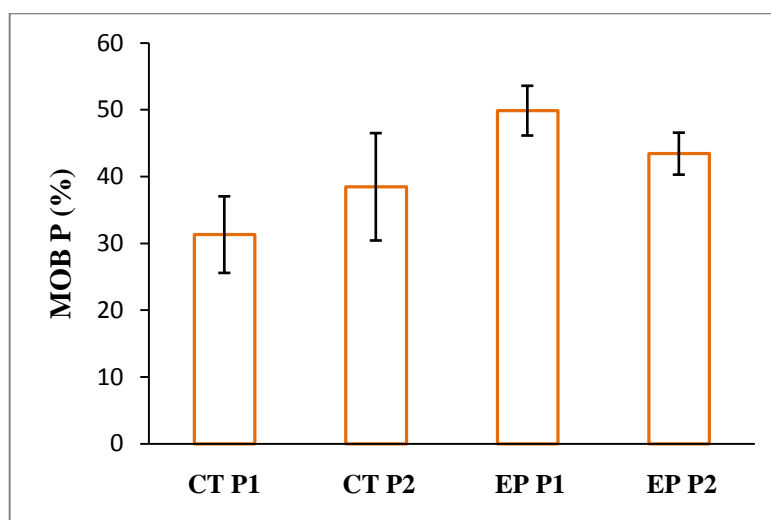
Não se verificou diferenças significativas entre a média da mobilidade total dos spz recolhidos a partir do EP (61,05%) ou por CT (53,55%). Também os protocolos anestésicos não exerceram influência significativa sobre a mobilidade total dos spz, independentemente da técnica de colheita utilizada.

A média dos spz com mobilidade progressiva (MOB P) nos quatro grupos está resumida na Tabela 6 e exemplificada no Gráfico 2.

Tabela 6 – Mobilidade progressiva (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)

MOB P (%)	CT P1	CT P2	EP P1	EP P2
Média	31,3	38,5	49,9	43,4
Erro padrão	5,7	8,0	3,7	3,1
Máximo	58,4	64,8	67,6	60,2
Mínimo	13,0	2,7	35,6	35,2

Gráfico 2 – Média da mobilidade progressiva (em percentagem) dos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)



Barras representam o erro padrão.

Da mesma forma que para a mobilidade total, também a média de spz com mobilidade progressiva é ligeiramente superior nas amostras obtidas a partir do EP (46,65%) comparativamente às recolhidas por CT (34,9%), no entanto, não se observaram diferenças significativas para este parâmetro. Tal como anteriormente observado, os protocolos anestésicos não exerceram influência significativa sobre a mobilidade progressiva dos spz.

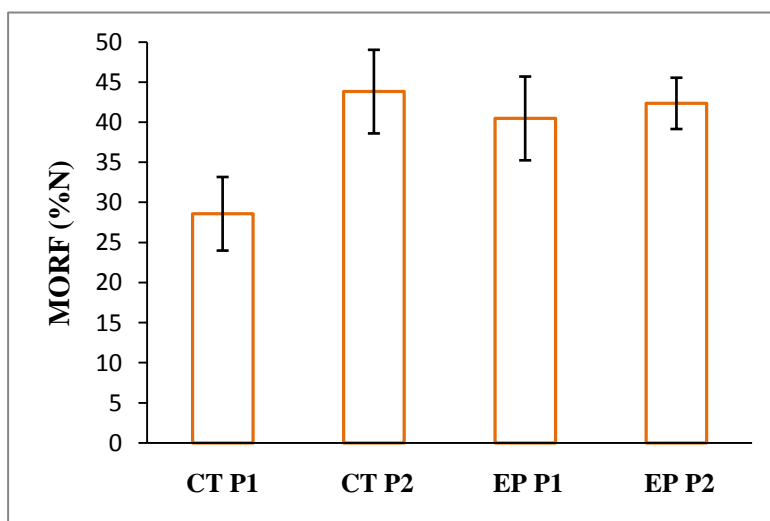
3.5. Viabilidade e morfologia

A média de spz vivos e com morfologia normal (MORF (N)) nos quatro grupos está resumida na Tabela 7 e exemplificada no Gráfico 3.

Tabela 7 – Espermatozóides vivos e morfolologicamente normais (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)

MORF (%N)	CT P1	CT P2	EP P1	EP P2
Média	28,6	43,8	40,5	43,4
Erro padrão	4,6	5,2	5,2	3,2
Máximo	52,7	66,4	58,6	57,1
Mínimo	14,2	26,2	22,6	31,3

Gráfico 3 – Média de spz vivos e morfolologicamente normais (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)



Barras representam o erro padrão.

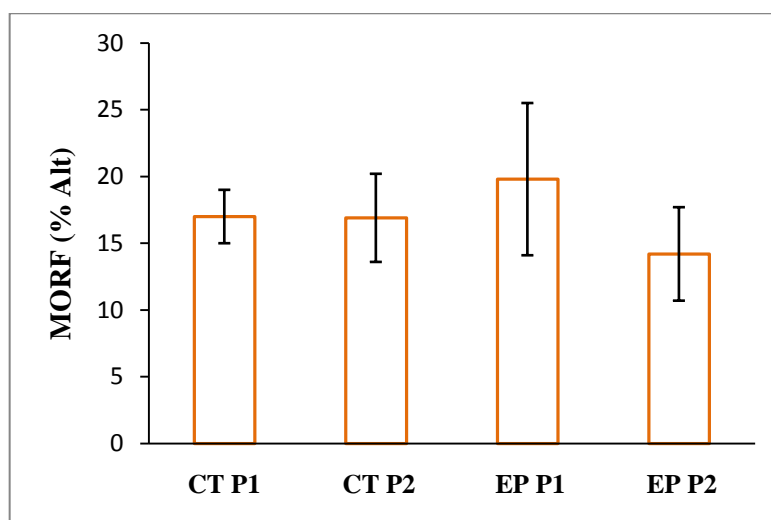
Embora exista um grupo, o CT P1, em que a média de spz vivos e morfolologicamente normais pareça ligeiramente inferior à dos restantes, a variação entre todos os grupos foi muito pouco heterogênea, não sendo significativas estas variações, tendo em conta as técnicas de recolha e os protocolos anestésicos utilizados.

A média de spz vivos com alterações morfológicas (MORF (%Alt)) dos quatro grupos está resumida na Tabela 8 e exemplificada no Gráfico 4.

Tabela 8 – Alterações morfológicas nos spz (em percentagem) no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)

MORF (%Alt)	CT P1	CT P2	EP P1	EP P2
Média	17,0	16,9	19,8	14,2
Erro padrão	2,0	3,3	5,7	3,5
Máximo	26,5	32,1	51,4	32,8
Mínimo	10,5	6,2	8,3	7,3

Gráfico 4 – Média das alterações morfológicas (em percentagem) nos spz no sémen recolhido por CT e a partir do EP, utilizando dois protocolos anestésicos diferentes (P1 e P2)

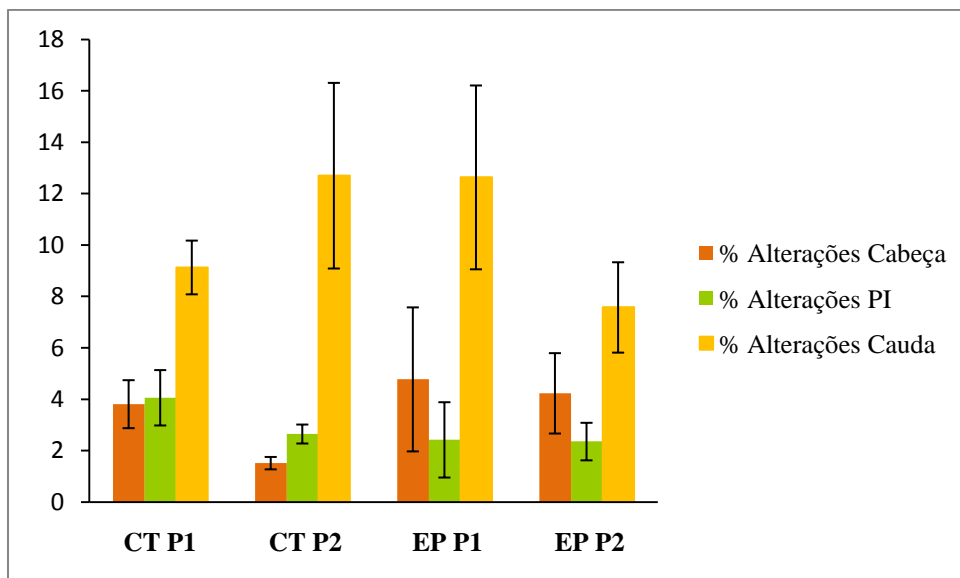


Barras representam o erro padrão.

À semelhança do sucedido para os parâmetros anteriormente enumerados, também aqui não se verificaram diferenças significativas entre protocolos anestésicos ou técnicas de recolha.

As alterações morfológicas observadas com maior frequência nos quatro grupos foram a macro e microcefalia, cabeças duplas ou destacadas, gotas citoplasmáticas proximal e distal e caudas duplas, dobradas ou enroladas, que foram classificadas de acordo com a parte do espermatozóide afectada.

Gráfico 5 – Média de spz vivos e com alterações na cabeça, peça intermédia (PI) e cauda (em percentagem) nos quatro grupos



Barras representam o erro padrão.

Pela observação directa do gráfico é possível concluir que as alterações que predominaram nos quatro grupos foram as da cauda. Independentemente da técnica de recolha e do protocolo anestésico utilizado não se observaram diferenças significativas para as alterações da cabeça, peça intermédia ou cauda.

Para podermos comparar os resultados obtidos neste estudo com os descritos na literatura para a morfologia, utilizamos os valores da Tabela 9 onde estão indicados os números de spz normais e com alterações morfológicas numa população de 100% vivos.

Tabela 9 – Registo da percentagem de spz normais ou com alterações morfológicas numa população de 100% de spz viáveis após coloração de eosina-nigrosina

				MORFOLOGIA (% com alt)		
ID	TC	P	MORF (% spz n)	Alt cabeça (%)	Alt PI (%)	Alt Cauda (%)
1	CT	1	56,7	6,7	0,0	36,6
2	CT	1	73,0	5,4	8,1	13,5
3	CT	1	50,0	16,7	16,65	16,65
4	CT	1	72,7	6,1	9,1	12,1
5	CT	1	54,1	5,4	8,1	32,4
6	CT	2	91,4	2,6	4,3	1,7
7	CT	2	68,0	6,0	10,0	16,0
8	CT	2	45,0	1,8	4,6	48,6
9	CT	2	68,2	0,8	1,6	29,4
10	CT	2	83,4	2,6	3,5	10,5
Média			66,3	5,4	6,6	21,7
Erro padrão			4,7	1,4	1,5	4,5
Máximo			91,4	16,7	16,65	48,6
Mínimo			45,0	0,8	0,0	1,7
1	EP	1	30,55	27,78	0,0	41,67
2	EP	1	78,1	0,0	0,0	21,9
3	EP	1	78,9	0,0	15,8	5,3
4	EP	1	74,29	5,71	0,0	20,0
5	EP	1	83,3	2,8	2,8	11,1
6	EP	2	88,3	5,4	3,6	2,7
7	EP	2	59,2	15,8	7,9	17,1
8	EP	2	81,0	0,0	2,0	17,0
9	EP	2	71,3	3,0	2,0	23,7
10	EP	2	83,2	7,5	2,8	6,5
Média			72,8	6,8	3,7	16,7
Erro padrão			5,3	2,8	1,5	3,6
Máximo			88,3	27,78	15,8	41,67
Mínimo			30,55	0,0	0,0	2,7

ID – Identificação do animal; TC – Técnica de colheita; CT – Cateterização uretral; EP – Epidídimo; P – Protocolo anestésico; MORF – Morfologia; n – normais; Alt – Alterações; PI – Peça intermédia.

4. DISCUSSÃO

Conforme referido anteriormente, o objectivo deste estudo foi comparar o efeito de duas técnicas de recolha e dois protocolos anestésicos nos parâmetros de qualidade do sémen do gato doméstico. Após a análise dos resultados deste estudo, pode-se concluir que independentemente da técnica de colheita de sémen utilizada, a partir do EP ou por CT, os valores obtidos para a mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia são semelhantes, não existindo diferenças significativas entre técnicas para estes parâmetros.

O facto da amostra ser reduzida e de haver grande variabilidade entre cada animal, poderá justificar a não existência de significância entre os resultados.

Os gatos utilizados para o estudo não foram seleccionados pela qualidade do sémen, existindo por isso variações individuais das características do sémen, tal como acontece na prática clínica.

É importante considerar que todos os métodos utilizados para a avaliação da qualidade do sémen neste estudo podem ter um erro associado à experiência do observador.

Para além dos aspectos já enunciados, deve-se ainda ter em mente, que uma comparação fiável entre estes dois métodos de colheita é difícil, pois as características do sémen podem ser influenciadas por diferenças nos protocolos de preparação das amostras (Filliers et al., 2010).

Todos os ejaculados recolhidos por CT apresentaram uma cor considerada normal para a espécie em questão. Não foi possível averiguar a cor das amostras recolhidas a partir do EP visto que, conforme referido anteriormente, a recolha foi efectuada colocando a cauda do EP seccionada em Tris-citrato, para permitir a dissipação dos spz passivamente para o meio circundante. Pela mesma razão, também o volume das amostras recolhidas a partir do EP não foi possível calcular. No caso da recolha por CT, o volume das amostras não foi possível calcular devido ao pequeno volume recolhido e à necessidade de introduzir Tris-citrato pela algália para conseguir retirar a totalidade do sémen recolhido, que ficou na parede da algália. Pelo facto da razão de diluição ser desconhecida não foi possível determinar a concentração da amostra independentemente da técnica de colheita de sémen utilizada.

Quanto ao pH, este não foi calculado porque conforme referido anteriormente, as amostras são imediatamente diluídas em Tris-citrato, o que iria falsear os valores obtidos. Para este tipo de medição as tiras recomendadas devem ter capacidade para medir intervalos inferiores a 0,5, pois segundo resultados de um estudo realizado por Zambelli et al. (2008), o pH médio das

amostras recolhidas por CT é de 7,0 sendo que, as variações observadas são na sua maioria decimais.

Em relação à mobilidade total, esta foi muito heterogénea entre animais, variando entre 18% e 80,2% e entre 51,9% e 83,8% para a recolha por CT e a partir do EP, respectivamente.

A mobilidade dos spz é extremamente sensível à temperatura (Zambelli & Levy, 2010) pelo que, a grande heterogeneidade verificada entre animais pode ser explicada pela ausência de platina térmica, o que dificulta o controlo da temperatura a cerca de 37°C durante a observação da amostra. A temperatura, ao baixar rapidamente, pode ser responsável por uma diminuição da mobilidade dos spz devido a choque térmico (Silva, 2006). De modo a contornar esta ausência, utilizaram-se luvas e botijas de borracha, com água aquecida no interior a cerca de 37°C, de modo a manter aquecidos todos os materiais de recolha, de acondicionamento e de observação de sémen. Embora Zambelli & Levy (2010) refiram que a mobilidade total é extremamente sensível à temperatura, de acordo com um estudo realizado por Hermansson e Axné (2007), os spz dos gatos não parecem ser tão sensíveis às temperaturas de refrigeração.

Visto que, a mobilidade pode estar relacionada com a duração da abstinência sexual (Axné et al., 1997) e como não existe conhecimento acerca da mesma para os gatos utilizados neste estudo, a heterogeneidade observada na nossa amostra pode estar relacionada com este factor. A menor mobilidade observada em gatos após longo período de abstinência sexual é, provavelmente, devido ao envelhecimento dos spz no epidídimo.

Neste estudo, para a mobilidade total, o valor médio obtido para as amostras recolhidas por CT (53,55%), foi inferior ao obtido por Zambelli et al. (2008) (78,1%) mas semelhante ao obtido por Filliers et al. (2010) (50,4%). Uma possível explicação para esta diferença prende-se com o facto de Zambelli et al. (2008) apenas ter incluído no seu estudo gatos com mais de 50% de spz com mobilidade progressiva.

O valor médio para a mobilidade total obtido para a colheita a partir do EP (61,05%) é inferior ao obtido por Filliers et al. (2010) (71,5%) mas ligeiramente superior ao obtido por CT no nosso estudo (53,55%), não sendo no entanto esta diferença significativa.

As diferenças observadas entre o nosso estudo e os anteriormente referidos, no que diz respeito à mobilidade total, podem ser o resultado do tipo de diluidor utilizado, dos protocolos anestésicos utilizados, protocolos de preparação dos spz e métodos de avaliação.

Embora no nosso estudo não tenham sido visíveis contaminações do sémen por urina nas amostras recolhidas por CT, estas podem ser responsáveis por uma redução da mobilidade dos spz (Griggers et al., 2001).

A presença de plasma seminal em amostras de sémen recolhidas por EE pode ser responsável por activar a mobilidade (Filliers et al., 2010). Geralmente, as amostras de sémen recolhidas por CT, apresentam elevadas concentrações e baixos valores de pH, o que sugere a presença mínima ou completa ausência de plasma seminal (Zambelli et al., 2008). Hermansson e Axné (2007) referiram ainda que, em outras espécies, os spz recolhidos a partir do EP são mais resistentes a temperaturas baixas do que os spz do ejaculado.

Os valores considerados normais para a mobilidade progressiva variam entre 60 e 90% (Johnston et al., 2001). Neste estudo, apenas o gato 6 apresenta valores de mobilidade progressiva superior a 60% para recolhas de sémen por CT e o gato 5 e o 9 para recolhas a partir do EP. No entanto, os valores médios obtidos para a mobilidade progressiva são comparáveis aos obtidos por Filliers et al. (2010) (34,9% *versus* 30,5% para a recolha por CT e 46,65% *versus* 50% para a recolha a partir do EP).

Foi estabelecido como normospermico, o sémen de gato com mais de 60% de spz normais (Stornelli, 2007). No nosso estudo, os valores individuais obtidos para a morfologia foram bons, com valores superiores a 60% de spz normais em 14 das 20 amostras recolhidas. A percentagem média de spz normais neste estudo, independentemente da técnica de recolha, ronda os 70%, pelo que, está de acordo com o descrito na obra de Johnston et al. (2001).

Neste estudo, independentemente da técnica de recolha de sémen, as alterações mais frequentes foram as alterações de cauda. Embora os valores médios obtidos por CT tenham sido ligeiramente superiores aos obtidos por EP, a diferença observada não é significativa. No entanto, esta ligeira diferença pode ser explicada pela pequena quantidade ou mesmo ausência de plasma seminal nas amostras de sémen recolhidas por CT (Zambelli et al., 2008), o que torna os spz particularmente susceptíveis às diferenças osmóticas causadas pela adição do meio de diluição, levando a um aumento da percentagem de spz com alterações de cauda (Axné & Linde-Forsberg, 2002).

Embora Filliers et al. (2010) tenha demonstrado que existem diferenças significativas em diversos parâmetros de qualidade do sémen recolhido por CT ou a partir do EP, neste estudo isso não se verificou.

Relativamente aos protocolos anestésicos, um dos objectivos iniciais deste estudo era avaliar o efeito da medetomidina utilizada isoladamente (P1) ou da associação medetomidina-

cetamina (P2) sobre os parâmetros de qualidade do sémen fresco: mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia. Embora para a CT esta avaliação tenha sido possível, para a recolha a partir do EP, verificou-se a necessidade de associar à medetomidina (P1) um anestésico para a orquiectomia, optando-se pela utilização de 10mg de cetamina por animal. No entanto, considerou-se que este não teve influência nos spz retirados do epidídimo pois o tempo decorrido entre a administração e a orquiectomia não nos parece suficiente para que possa existir acção da mesma sobre os spz.

Após a análise dos resultados deste estudo, pode-se também concluir que independentemente do protocolo anestésico utilizado, medetomidina isolada ou associação de medetomidina com cetamina, nas doses acima referidas, os valores obtidos para a mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia são semelhantes, não sendo significativas as diferenças observadas entre protocolos para estes parâmetros.

5. CONCLUSÃO

Independentemente da técnica de colheita utilizada, por CT ou a partir do EP, ou do protocolo anestésico utilizado, medetomidina isolada ou associação de medetomidina com cetamina, as diferenças observadas para a mobilidade total, mobilidade progressiva e morfologia não foram significativas.

Até à data, existem poucos estudos que comparem as características do sémen recolhido por CT e a partir do EP. Com a realização deste estudo conclui-se que é possível realizar na prática clínica colheitas de sémen, sem recurso a equipamentos específicos ou a animais treinados, o que constitui uma vantagem para o futuro. A colheita por CT apresenta vantagens sobre a obtenção de sémen a partir do EP porque pode ser repetida inúmeras vezes no mesmo animal, é menos complicada a sua realização e requer menor tempo para a preparação da amostra. No entanto, a colheita de sémen a partir do EP permite a recolha de sémen em animais domésticos ou silvestres, de grande estima ou elevado valor genético, após morte ou orquiectomia.

IV – BIBLIOGRAFIA

- Axnér, E., Ström, B. & Linde-Forsberg, C. (1997). Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, 47(4), 929-934.
- Axnér, E., Ström Holst, B. & Linde-Forsberg, C. (1998). Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 50(6), 973-979.
- Axnér, E. & Linde-Forsberg, C. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen & C. Linde-Forsberg (Eds.), *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca, NY, USA: International Veterinary Information Service. Acedido em Set 15, 2010, disponível em http://www.ivis.org/advances/Concannon/axner/chapter_frm.asp?LA=1
- Axnér, E. & Linde-Forsberg, C. (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study [abstract]. *Reprod Domest Anim*, 42(3), 282-291.
- Chatdarong, K., Ponglowhapan, S., Manee-in, S. & Pongphet, K. (2006). The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. *Theriogenology*, 66(6-7), 1615-1617.
- Cortopassi, S.R.G. & Fantoni, D.T. (2002). Medicação pré-anestésica. In D.T. Fantoni & S.R.G. Cortopassi, *Anestesia em cães e gatos*. (pp.151-158). São Paulo: Roca.
- Cunha, I.C.N. (2008). Exame andrológico do cão. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, 1(1), 49-65.
- Cunningham, J.G. (2002). *Textbook of veterinary physiology*. (3rh ed.). Philadelphia, Pa.: W.B. Saunders Co.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (1996). *Textbook of veterinary anatomy*. (2nd ed.). Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Co.
- da Silva, T.F.P. (2008). *Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologia do sémen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117®)*. Tese para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Veterinárias. Fortaleza, Ceará: Universidade Estadual do Ceará. Acedido em Set 15, 2010, disponível em <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/ticianasilva.pdf>
- England, G.C.W. (2010). Physiology and endocrinology of the male. In G. England & A. von Heimendahl (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology*. (2nd ed.). (pp.13-22). England: British Small Animal Veterinary Association.

- Fagundes, A.K.F., Moura, M.R.P., Oliveira, É.C.S. & da Silva Jr, V.A. (2010). Colheita de sêmen de gatos domésticos por meio de eletroejaculação... peculiaridades e desafios. *Trabalho apresentado na X Jornada de ensino, pesquisa e extensão da UFRPE – JEPEX, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil, 19-23 Outubro*. Acedido em Fev 1, 2011, disponível em: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R1743-1.PDF>
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. (3rd ed.). St. Louis, Mo: Saunders.
- Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., De Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C.E. & Van Soom, A. (2008). Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology*, 70(9), 1550-1559.
- Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., Zambelli, D., Anastasi, P., Hoogewijs, M. & Van Soom, A. (2010). In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, 74(1), 31-39.
- França, L.R. & Godinho, C.L. (2003). Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*) [abstract]. *Biol Reprod*, 68(5), 1554-1561.
- Freshman, J.L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract*, 17(3), 104-107.
- Griggers, S., Paccamonti, D.L., Thompson, R.A. & Eilts, B.E. (2001). The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoa motility. *Theriogenology*, 56(4), 194-199.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2000). *Textbook of Medical Physiology*. (10th ed.). Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Co.
- Hermansson, U. & Axné, E. (2007). Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 degrees C. *Theriogenology*, 67(7), 1239-1248.
- Hewitt, D. (1998). Physiology and endocrinology of the male. In G.M. Simpson, G.C.W. England & M. Harvey (Eds.), *BSAVA Manual of small animal reproduction and neonatology*. (pp.61-69). United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association.
- Howard, J.G., Brown, J.L., Bush, M. & Wildt, D.E. (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim-up processing. *Journal of Andrology*, 11(3), 204-215.
- Howard, J; Bush, M., Wildt D.E. (1991). Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae [abstract]. *J Androl*, 12(1), 36-45.





















- Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V. & Olson, P.S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Co.
- Jordan, H.L., Howard, J., Sellon, R.K., Wildt, D.E., Tompkins, W.A. & Kennedy-Stoskopf, S. (1996). Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination [abstract]. *J Virol*, 70(11), 8224-8228.
- Leite, D.K.V.H. (2009). *Avaliação das características histológicas, citológicas, clínicas e seminais de felinos domésticos e selvagens*. Tese para obtenção do grau de Doutor. Niterói: Universidade Federal Fluminense. Acedido em Mar 20, 2011, disponível em http://www.bdt.d.ndc.uff.br/tde_arquivos/20/TDE-2010-02-08T060253Z-2376/Publico/TEDE-Tese-Dala%20Leite.pdf
- Lemke, K. (2003). Preanestésicos y anestésicos complementarios. In J.C. Thurmon, W.J. Tranquilli & G.J. Benson, *Fundamentos de anestesia y analgesia en pequeños animales: farmacología*. (pp. 109-111). Barcelona: Elsevier Masson.
- Lin, H.C. (2003). Anestésicos dissociativos. In J.C. Thurmon, W.J. Tranquilli & G.J. Benson, *Fundamentos de anestesia y analgesia en pequeños animales: farmacología*. (pp. 119-123). Barcelona: Elsevier Masson.
- Linde-Forsberg, C. & Axné, E. (1998). Mating and artificial insemination in domestic cat. In G.M. Simpson, G.C.W. England & M. Harvey (Eds.), *BSAVA Manual of small animal reproduction and neonatology*. (pp.105-111). United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association
- Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., Leoni, S. & Ruggiero, C. (2003). Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5(4), 203-208.
- Malandain, E. (2005). Artificial insemination in cats. *Paper presented in ESAVS-EVSSAR-ENVN Reproduction in companion, exotic and laboratory animal, Nantes, 12-17 September, 25*. Acedido em Fev 1, 2011, disponível em http://www.esavs.net/course_notes/reproduction1_05/artificial_insemination_cat.pdf
- Martins, M.I.M (2007). Perspectivas da aplicação comercial de biotecnologias envolvendo espermatozóides obtidos de epidídimo de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), 115-118.
- Matos, D.L., Araújo, A.A., Roberto, I.G. & Toniolli, R. (2008). Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, 32(4), 225-232.
- Memon, M. & Tibary, A. (2001). Canine and feline cryptorchidism. In P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen & C. Linde-Forsberg (Eds.), *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service. Acedido em Fev 19, 2011, disponível em http://www.ivis.org/advances/Concannon/memon/chapter_frm.asp?LA=1
- Muir, W.W., Hubbell, J.A.E., Skarda, R.T. & Bednarski, R.M. (2000). *Handbook of veterinary anesthesia*. (3rd ed.). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.

- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. & England, G.C.W. (2001). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. (8th ed.). Philadelphia: Saunders.
- Pawson, P. & Forsyth, S. (2002). Anesthetic agents. In J. Maddison, S. Page & D. Church (Eds.), *Small animal clinical pharmacology*. (pp.69-100). London: W.B.Saunders.
- Pawson, P. (2002). Sedatives. In J. Maddison, S. Page & D. Church (Eds.), *Small animal clinical pharmacology*. (pp.101-114). London: W.B.Saunders.
- Posner, L.P. & Burns, P. (2009). Injectable anesthetic agents. In J.E. Riviere & M.G. Papich, *Veterinary pharmacology & therapeutics: anesthetic agents*. (9th ed.)(pp.265-300). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Reyna, J.C., Savignone, C.A., Guzzetti, J., Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., de la Sota, R.L. & Stornelli M.A. (2005a). Estudio de la estructura testicular en el gato domestico y su relación con la estación reproductiva. *Trabajo presentado en VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Ciudad Universitaria de Córdoba, Argentina, 24-26 Junio*, pp.515. Instituto de Reproducción Animal Córdoba.
- Reyna, J.C., Savignone, C.A., Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Catalano, V.A., de la Sota, R.L. & Stornelli, M.A. (2005b). Variaciones observadas en el túbulo seminal y espacio intersticial del gato doméstico en diferentes épocas del año. *Trabajo presentado en Jornadas de divulgación técnico-científicas de la Universidad Nacional de Rosario – Facultad de Ciencias Veterinarias, Casilda, Argentina, 5 Agosto*, pp.158-159. UNR Editora.
- Reyna, J.C., Savignone, C.A., Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Núñez Favre, R., Giménez, F., de la Sota, R.L. & Stornelli, M.A. (2006a). Estudio histológico de testículos de gatos sometidos a un régimen de luz natural. *Trabajo presentado en XXIII Jornadas Científicas Asociación de Biología de Tucumán, Tafí del Vale, Argentina, 28-30 Setiembre*, pp.310. Ediciones Magna.
- Reyna, J., Savignone, C.A., Stornelli, M.C., Giménez, F., Tittarelli, C.M., de la Sota, R.L. & Stornelli, M.A. (2006b). Relación entre fotoperíodo y producción espermática en el gato doméstico [abstract]. *Trabajo presentado en XXVII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA e III Congresso FIAVAC, Centro de Convenções de Vitória, Espírito Santo, Brasil, 31 Maio-3 Junho*, pp.91. ANCLIVEPA.
- Root Kustritz M.V. (2007). The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68(3), 329-337.
- Salviano, M.B. & Souza, J.A.T. (2008). Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. *Rev Bras Reprod Animal*, 32(2), 159-167.
- Silva, J.R. (2006). Recolha e avaliação de ejaculados de garanhão em condições de campo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101(559-560), 305-309.

- Stornelli, M.A., Stornelli, M.C., Savignone, C.A., Tittarelli, C.M., Reyna, J.C. & de la Sota, R.L. (2004). Influencia del fotoperíodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. *Trabajo presentado en I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos da FCV Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina*.
- Stornelli, M.A. (2007). Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodologías especiales felino. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), 135-140.
- Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Hori, T. & Tsutsui, T. (2000). Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*, 62(11), 1163-1167.
- Tebet, J.M., Martins, M.I.M., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D. & Lopes, M.D. (2006). *Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa*. *Theriogenology*, 66(6-7), 1629-1632.
- Traas, A.M. (2010). Feline reproduction. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. (7th ed.).(pp.1940-1948). St. Louis, Mo: Elsevier Saunders.
- Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M. & Hori, T. (2000a). Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats [abstract]. *J Vet Med Sci*, 62(12), 1241-1245.
- Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M. & Hori, T. (2000b). Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats [abstract]. *J Vet Med Sci*, 62(12), 1247-1251.
- Tsutsui, T., Tanaka, A. & Hori, T. (2001). Intratubal insemination with fresh semen in cats [abstract]. *J Reprod Fertil Suppl*, 57, 347-351.
- Tsutsui, T. (2006). Artificial insemination in domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66 (1), 122-125.
- Valadão, C.A.A. (2002). Anestésicos dissociativos. In D.T. Fantoni & S.R.G. Cortopassi, *Anestesia em cães e gatos*. (pp. 165-173). São Paulo: Roca.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.
- Verstegen-Onclin, K.M. & Verstegen, J.P. (2006) Semen collection and artificial insemination in the cat. In North American Veterinary Conference (Eds.), *Proceedings of the NAVC: Small Animal Edition, Orlando, Flórida, 7-11 January, 2006*, pp.1279-1281. Acedido em Mar 4, 2011, disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/456.asp?LA=1>
- Villaverde, A.I., Martins, M.I., Castro, V.B. & Lopes, M.D. (2006). Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66(6-7), 1641-1644.

- Villaverde, A.I.S.B. & Lopes, M.D. (2007). Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sémen criopreservado. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), 77-83.
- Villaverde, A.I.S.B., Melo, C.M.M., Corrente, J.E., Papa, F.O. & Lopes, M.D. (2008). Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozóides de gato doméstico (*Felis catus*). *Ciência Animal Brasileira*, 9(3), 686-692.
- Zambelli, D. & Cunto, M. (2006). Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, 66(2), 159-165.
- Zambelli, D., Cunto, M., Prati, F. & Merlo, B. (2007). Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, 68(5), 796-803.
- Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E. & Merlo, B. (2008). Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, 69(4), 485-490.
- Zambelli, D. & Levy, X. (2010). Clinical approach to the infertile male. In G. England & A. von Heimendahl (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology*. (2nd ed.). (pp.70-79). England: British Small Animal Veterinary Association.

ANEXO I – Alterações morfológicas dos spz**Tabela 10** – Alterações morfológicas dos spz classificadas de acordo com a parte do espermatozóide afectada (adaptado de: Johnston et al., 2001)

Alterações Cabeça		Dupla
		Macrocefalia
		Microcefalia
		Piriforme
		Destacada
		Cónica
		Forma de chama
		Separada
Alterações Peça Intermédia		Gota citoplasmática proximal
		Gota citoplasmática distal
		Dupla
		Espessada
		Abaxial
		Dobrada
Alterações Cauda		Dupla
		Dobrada
		Torcida
		Enrolada proximalmente
		Enrolada distalmente
		Cauda fortemente enrolada com peça intermédia